



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Unidad de Posgrado

**Determinación de micotoxinas por el método de Elisa
en soya para aves en producción en la provincia de
Chincha, año 2016**

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Microbiología

AUTOR

Agustín Mercedes GUERRERO CANELO

ASESOR

Dr. Juan Manuel PARREÑO TIPIAN

Lima, Perú

2018



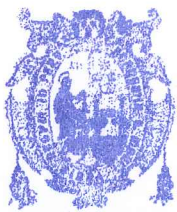
Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Guerrero A. Determinación de micotoxinas por el método de Elisa en soya para aves en producción en la provincia de Chincha, año 2016 [Tesis de maestría]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Unidad de Posgrado; 2018.



**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR
AL GRADO ACADÉMICO DE MAGÍSTER EN MICROBIOLOGÍA**

Siendo las **10:00 hrs. del 18 de diciembre de 2018** se reunieron en el auditorio de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, el Jurado Examinador y Calificador de tesis, presidido por la Dra. Amparo Iris Zavaleta Pesantes e integrado por los siguientes miembros: Dr. Juan Manuel Parreño Tipian (Asesor), Dra. María Elena Salazar Salvatierra, Mg. Julio Reynaldo Ruiz Quiroz y el Mg. Luis Alberto Inostroza Ruiz; para la sustentación oral y pública de la tesis intitulada: **"DETERMINACIÓN DE MICOTOXINAS POR EL MÉTODO DE ELISA EN SOYA PARA AVES EN PRODUCCIÓN EN LA PROVINCIA DE CHINCHA, AÑO 2016"**, presentada por el Bachiller en Ciencias Veterinarias **AGUSTIN MERCEDES GUERRERO CANELO**.

Acto seguido se procedió a la exposición de la tesis, con el fin de optar al Grado Académico de **Magíster en Microbiología**. Formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por el graduando.

A continuación el Jurado Examinador y Calificador de tesis procedió a la calificación, la que dio como resultado el siguiente calificativo:

DIECISEIS (16) BUENO

Luego, la Presidenta del Jurado recomienda que la Facultad proponga que se le otorgue al Bachiller en Ciencias Veterinarias **AGUSTIN MERCEDES GUERRERO CANELO**, el Grado Académico de Magíster en **Microbiología**.

Siendo las **11:15** hrs. se levanta la sesión.

Se extiende el acta en Lima, a las **11:20** hrs. del 18 de diciembre de 2018.

Dra. Amparo Iris Zavaleta Pesantes (P.P., T.C.)
Presidenta

Dr. Juan Manuel Parreño Tipian (P.P., T.C.)
Miembro - Asesor

Dra. María Elena Salazar Salvatierra (P.P., T.C.)
Miembro

Mg. Julio Reynaldo Ruiz Quiroz (P. Asoc., T.C.)
Miembro

Mg. Luis Alberto Inostroza Ruiz (P. Aux., T.P.)
Miembro

Observaciones:

AGRADECIMIENTO

A Dios, por darme la vida y salud.

Al “Dr. Juan Manuel Parreño Tipian”, por su asesoría para la realización del presente estudio que me permitirá dar un paso más en mi carrera profesión al graduarme como Magíster en Microbiología.

A los profesores de la Maestría de Microbiología, por la formación y orientación en la obtención del conocimiento a través de la investigación.

A la “Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional San Luis Gonzaga de Ica”, para llevar a cabo los análisis del estudio.

A SENASA – CHINCHA por sus facilidades en el muestreo de la soya.

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mi padre Agustín y a mi madre Marina, quienes me inculcaron perseverancia para lograr objetivos respetando a los demás.

A mis hermanos: Marina, Rufino, Dany y Dante. A mis sobrinos: Julio, Marina, Ulises, Jayo, July, Alexander, Daniel, Angela, Emelyn, Danilo, Yobana y Tatiana. A mis tios, tias y demás familiares.

A mis amigos de la Maestria de Microbiología: Carlos, Roldan, Jacqueline, Jimmy, Celso, Fiorella, Ramón, Margarita, Karina, Joel, Flor de Maria, Wilson y Rosa.

A mis colegas, alumnos y amigos de la “Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional San Luis Gonzaga de Ica”.

ÍNDICE

Abreviaturas	i
Lista de cuadros	ii
Lista de figuras	iv
Resumen	v
Summary	vi
CAPÍTULO 1: Introducción	1
1.1. Situación problemática	4
1.2. Formulación del problema	6
1.3. Justificación teórica	6
1.4. Justificación práctica	6
1.5. Objetivos	7
1.5.1. Objetivo general	7
1.5.2. Objetivos específicos	7
CAPÍTULO 2: Marco teórico	8
2.1. Marco “filosófico o epistemológico de la investigación”	8
2.2. Antecedentes de la investigación	9
2.3. Bases teóricas	15
2.3.1. Micotoxinas	15
2.3.1.1. Factores condicionantes para el desarrollo de los hongos y producción de micotoxinas	18
2.3.1.1.1. Factores físicos	18
2.3.1.1.1.1. Humedad y actividad del agua (aw)	18
2.3.1.1.1.2. Temperatura	20
2.3.1.1.1.3. Zonas de miclofora	22
2.3.1.1.1.4. Integridad física de los granos	23
2.3.1.1.2. Factores químicos	24
2.3.1.1.2.1. pH	24
2.3.1.1.2.2. Composición del sustrato	24
2.3.1.1.2.3. Minerales	25
2.3.1.1.2.4. Potencial de oxido reducción (O ₂ /CO ₂)	25
2.3.1.1.3. Factores biológicos	25

2.3.1.1.3.1.	Presencia de invertebrados	25
2.3.1.1.3.2.	Cepas específicas	26
2.3.1.2.	Aflatoxinas (AFs)	26
2.3.1.3.	Ocratoxinas (OTs)	28
2.3.1.4.	Tricotecenos	29
2.3.1.5.	Normativas y regulaciones de las micotoxinas	32
2.3.1.6.	Análisis de micotoxinas en los alimentos	34
2.3.1.6.1.	Técnicas de muestreos	35
2.3.1.6.2.	Preparación de la muestra: extracción y limpieza de micotoxinas	38
2.3.1.6.3.	Métodos analíticos de micotoxinas	40
2.3.1.6.3.1.	Métodos inmunoquímicos	40
2.3.1.6.3.1.1.	ELISA competitivo directo	40
2.3.1.6.3.1.2.	ELISA competitivo indirecto	41
2.3.1.6.3.2.	Técnicas cromatográficas	43
2.3.2.	Frijol soya	44
2.3.2.1.	Características nutricionales	45
2.3.2.2.	Importancia de la soya en la alimentación animal	46
2.3.2.3.	Contaminación de la soya por micotoxinas	46
CAPÍTULO 3: Metodología		49
3.1.	Tipo y diseño de investigación	49
3.2.	Unidad de análisis	49
3.3.	Población de estudio	49
3.4.	Tamaño de muestra	49
3.5.	Determinación de los niveles de micotoxinas en las muestras de soya	49
3.5.1.	Selección de las muestras de soya	50
3.5.2.	Preparación y extracción de micotoxinas de las muestras de soya, según las recomendaciones del fabricante (Neogen Corporation)	50
3.5.2.1.	Preparación de las muestras de soya	50
3.5.2.2.	Extracción de micotoxinas de las muestras de soya	50
3.5.2.2.1.	Extracción de AFB ₁ , según las recomendaciones del fabricante (Neogen Corporation, 2008)	50
3.5.2.2.2.	Extracción de OTA, según las recomendaciones del fabricante (Neogen Corporation, 2012)	51
3.5.2.2.3.	Extracción de toxina T – 2, según las recomendaciones del	

fabricante (Neogen Corporation, 2014)	51
3.5.3. Detección y cuantificación de micotoxinas mediante ELISA	
competitivo directo, según las recomendaciones del fabricante	
(Neogen Corporation)	51
3.5.3.1. Detección cualitativa de micotoxinas	51
3.5.3.1.1. Detección de AFB₁ (Neogen Corporation, 2008)	51
3.5.3.1.2. Detección de OTA (Neogen Corporation, 2012)	52
3.5.3.1.3. Detección de toxina T – 2 (Neogen Corporation, 2014)	53
3.5.3.2. Detección cuantitativa de micotoxinas	53
3.6. Técnica de recolección de datos	54
3.7. Estándares de los niveles máximos permitidos de micotoxinas en soya	54
CAPÍTULO 4: Resultados y Discusión	55
4.1. Análisis, interpretación y discusión de resultados	55
4.2. Presentación de resultados	58
CONCLUSIONES	63
RECOMENDACIONES	64
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
Anexo 1	75
Anexo 2	76
Anexo 3	77
Anexo 4	78
Anexo 5	79
Anexo 6	80

ABREVIATURAS

AFs : Aflatoxinas

AFB₁ : Aflatoxina B₁

ALT : Alanine Aminotransferase

APPCC : Análisis de peligros y puntos críticos de control

AST : Aspartate aminotransferase

a_w : Water activity

AVAD: “Años de Vida ajustados en función de la discapacidad”

BPAs : Buenas prácticas agrícolas

BPM : Buenas prácticas de manufactura

DAS : Diacetoxiscirpenol

DON : Deoxinivalenol

ELISA : Enzyme – Linked ImmunoSorbent Assay

ETAs : Enfermedades Transmitidas por Alimentos

FAO : Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

FDA : Food and Drug Administration

HPLC – FLD : High – performance liquid chromatography with fluorescence detection

HRE : Humedad Relativa de Equilibrio

HRP : Horseradish peroxidase

LC – MS : Liquid chromatography – mass spectrometry

NMP : Niveles máximos permitidos

NRC : Nutrient requirements of poultry

OMS : Organización Mundial de la Salud

OTA : Ocratoxina A

ppb : Partes por billón

ppm : Partes por millón

SENASA : Servicio Nacional de Sanidad Agraria

T – 2 : Toxina T – 2

UE : Unión Europea

USFDA : US Food and Drug Administration

LISTA DE CUADROS

1.	“Ocurriencia natural de OTA en frijol soya y productos de soya”.	12
2.	Producción de micotoxinas de <i>Fusarium sporotrichioides</i> en soya.	13
3.	Principales micotoxinas y límites en la alimentación animal, según la USFDA y la Unión Europea.	17
4.	“Valores de aw necesarios para el desarrollo de algunos mohos y para la producción de algunas micotoxinas”.	19
5.	Temperatura mínima necesaria para el desarrollo de algunos mohos y para la producción de algunas micotoxinas.	21
6.	Temperatura y aw exigidas para el desarrollo de algunos mohos y para la producción de algunas micotoxinas.	21
7.	“Relación entre la humedad de varios cereales y oleaginosas y las diferentes HRE a 25 – 30 °C”.	22
8.	“Producción de aflatoxinas (ppm) por el <i>Aspergillus parasiticus</i> en diversos sustratos”.	24
9.	Tricotecenos, según grupo funcional.	31
10.	Niveles máximos permitidos de micotoxinas en el alimento para animales.	33
11.	Error total del análisis de micotoxinas.	35
12.	Cantidad mínima de muestra, según el tamaño del lote.	37
13.	Sensibilidad de ELISA para ensayos de micotoxinas.	42
14.	“Contenido de los principales nutrientes del grano entero y la torta de soya”	45
15.	Producción de aflatoxinas por <i>Aspergillus parasiticus</i> inoculados en soya no esterilizados y esterilizados.	47
16.	“Número de muestra, según los molinos de los distritos de la provincia de Chíncha”.	49
17.	“Niveles máximos permitidos de micotoxinas para la soya”.	54
18.	Niveles de aflatoxina B ₁ en soya, según los distritos de la provincia de Chíncha.	59
19.	“Niveles de ocratoxina en soya, según los distritos de la provincia de Chíncha”.	60
20.	“Niveles de toxina T – 2 en soya, según los distritos de la provincia de Chíncha”.	61
21.	Valores mayores a los niveles máximos permitidos de	

micotoxinas, según los distritos de la provincia de Chincha.

LISTA DE FIGURAS

1.	Estructura molecular de las ocratoxinas	28
2.	Estructura molecular de los tricotecenos	30
3.	Análisis de micotoxinas en los alimentos	34
4.	ELISA competitivo directo para micotoxinas	41

RESUMEN

La industria avícola es “generadora de alimentos proteicos de alto valor para la población humana, en la forma de carne y huevos”. Para su alimentación, la soya es uno de los insumos más importantes debido a que contiene alrededor de 20 % de grasa, 40 % de proteínas y 30 % de carbohidratos. Sin embargo, se han reportado, soya contaminada con aflatoxinas, ocratoxina A y toxina T – 2. Por lo que en el presente estudio, se determinó las mencionadas “micotoxinas por ELISA” competitivo directo en “soya para aves de producción en la provincia de Chíncha”. El 100 % (20/20) de los molinos de los distritos (Chíncha Alta, Pueblo Nuevo, Grocio Prado, Sunampe y Alto Larán), con resultados positivos para aflatoxina B₁, ocratoxina A y toxina T – 2. “Niveles máximos permitidos” para AFB₁ (10 ppb), OA (50 ppb) y toxina T – 2 (150 ppb). La soya para aves contenía OA y toxina T – 2, con 20 % y 60 % por encima del NMP respectivamente. Riesgo de “ocratoxicosis aguda” por el consumo de soya de molinos “Grocio Prado, Sunampe y Alto Larán” y “micotoxicosis aguda” por toxina T – 2, de los distritos de Chíncha, excepto “Chíncha Alta”.

Palabras clave: Aflatoxina B₁, ocratoxina A, toxina T – 2, soya, aves en producción, ELISA competitivo directo, Chíncha.

SUMMARY

The poultry industry is "a generator of protein foods of high value to the human population, in the form of meat and eggs." For food, soy is one of the most important inputs because it contains around 20 % fat, 40 % protein and 30 % carbohydrates. However, they have been reported, soybean contaminated with aflatoxins, ochratoxin A and T – 2 toxin. So in the present study, we determined the aforementioned "mycotoxins by ELISA" competitive direct in "soybeans for poultry production in the province of Chincha ". 100 % (20/20) of the mills in the districts (Chincha Alta, Pueblo Nuevo, Grocio Prado, Sunampe and Alto Larán), with positive results for aflatoxin B1, ochratoxin A and toxin T – 2. "Maximum levels allowed" for AFB1 (10 ppb), OA (50 ppb) and T – 2 toxin (150 ppb). The soybeans for poultry contained OA and T – 2 toxin, with 20 % and 60 % above the NMP respectively. Risk of "acute ochratoxicosis" due to the consumption of mill soils "Grocio Prado, Sunampe and Alto Larán" and "acute mycotoxicosis" due to T – 2 toxin, from the districts of Chincha, except "Chincha Alta".

Key words: Aflatoxin B1, ochratoxin A, T – 2 toxin, soybeans, birds in production, direct competitive ELISA, Chincha.

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

La soya es uno de los granos más importantes del mundo. Contiene alrededor de 20 % de grasa, 40 % de proteínas, y 30 % de carbohidratos. Se utiliza principalmente como fuente de aceite comestible y proteína forrajera (Zhen et al., 2018).

La soya es una especie de leguminosa que se originó en el este de Asia y uno de los cultivos más importantes en el mundo. En 2016/17, Brasil produjo un estimado de 114 millones de los 351 millones de toneladas métricas de soya del mundo (32,5 %), convirtiéndolos en uno de los cultivos agrícolas más valiosos del país. Brasil es el primer exportador de soya y segundo productor de este importante cultivo, solo por detrás de los Estados Unidos (USDA, 2016).

Como la mayoría de los cultivos agrícolas, los rendimientos de la soya están amenazados por plagas, contaminación y otros factores ambientales que reducen la producción mundial en un 26 % anual y contribuyen al continuo problema de mantener un suministro de alimentos que pueda alimentar a la creciente población mundial (Prakash et al., 2013).

“Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs), son generalmente de carácter infeccioso o tóxico. Entre las toxinas naturales con más riesgos para la salud, abarcan las micotoxinas, las biotoxinas marinas, los glucósidos cianogénicos y las toxinas de las setas venenosas” (OMS, 2015).

Los principales mohos contaminantes de los alimentos con micotoxinas son miembros de los géneros de hongos: *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium* (Marin et al., 2013). Mientras que las especies de *Aspergillus* y *Penicillium* crecen frecuentemente en alimentos en condiciones de almacenamientos, las especies de *Fusarium* a menudo infectan cultivos en crecimiento como el trigo, cebada y maíz en el campo que se propagan en la planta (Bennett y Klich, 2003).

“Las micotoxinas, son compuestos policetónicos, de bajo peso molecular, generalmente entre 300 a 400 daltons, que se generan al principio de la fase estacionaria o al final de la fase exponencial del crecimiento del moho, durante las

reacciones de condensación en la que se interrumpe la reducción de los grupos cetónicos en la biosíntesis de los ácidos grasos” (Gimeno y Martins, 2011).

Las micotoxinas pueden ser tóxicas para las poblaciones humanas y animales. La exposición a las micotoxinas puede contribuir a una variedad de efectos adversos para la salud, como efectos hepatotóxicos, nefropatía, carcinogénesis, citotóxicos, inmunosupresores, inflamatorios, neurológicos, estrogénesis y/o teratogénesis (Fromme et al., 2016).

Las micotoxinas en su contacto directo e inhalación, representan rutas menores de exposición, mientras que la mayoría de la exposición humana ocurre a través de la ingesta de alimentos contaminados. Se estima un 25 % de la oferta mundial de cereales contaminados con micotoxinas (Tran et al., 2012).

“La contaminación de los alimentos con micotoxinas puede ser de forma indirecta a través de los residuos de estos en la carne, huevos y leche como consecuencia del consumo de alimentos contaminados con micotoxinas por parte del animal; o de forma directa de mohos toxigénicos sobre los alimentos: cereales, productos de cereales, frutos secos, frutas, y otros” (Gimeno y Martins, 2011).

Las aflatoxinas son producidas por varias especies de *Aspergillus*, de las cuales *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* son las fuentes más importantes de contaminaciones de los alimentos. *A. flavus* produce la forma B mientras que *A. parasiticus* produce las formas B y G (Pitt et al. 2013).

La aflatoxina B₁ (AFB₁) es la más común y potente de las aflatoxinas, se clasifica como carcinogénesis del grupo 1 y es un “factor de riesgo para el desarrollo del carcinoma hepatocelular”, según la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC, 2012). Además, la exposición a la aflatoxina sinergia con la infección crónica por el “virus de la hepatitis B” y aumenta el “riesgo de cáncer de hígado” (Liu et al. 2012).

La exposición a aflatoxinas en la dieta también puede afectar el sistema inmunitario y funciones renales (Mulder et al. 2015).

La ocratoxina A (OTA) es producida por el hongo *Penicillium verrucosum* y varias especies de *Aspergillus*, y es de gran importancia para la salud pública y la agroeconomía (Coronel et al., 2010).

La exposición a bajas concentraciones de OTA en animales domésticos y experimentales conduce a alteraciones morfológicas y funcionales en los tejidos renales y hepáticos. Además, la IARC, lo ha clasificado dentro del grupo 2B como potencialmente carcinógeno, genotóxico y teratogénesis para los humanos (Malir et al., 2013).

“Las micotoxinas tricotecenas, son producidas esencialmente por *Fusarium tricinctum*, *F. nivale*, *F. roseum*, *F. graminearum*, *F. solani*, *F. oxysporum*, *F. lateritium*, *F. sporotrichioides*, *F. rigidiusculum*, *F. episphaeria* y *F. poae* (Gimeno y Martins, 2011). Pueden encontrarse como contaminantes naturales en los cereales (maíz, cebada, sorgo, avena, trigo, arroz, centeno, mijo) y productos de cereales” (Gimeno y Martins, 2011). El principal síndrome que provocan los tricotecenos es el gastroentérico pero también afectan los sistemas nervioso y circulatorio, y la piel (Gimeno y Martins, 2011).

La micotoxicosis implica enormes pérdidas de orden económico, sanitario y comercial; principalmente por sus propiedades anabolizantes, estrogénicas, carcinogénicas, mutagénicas y teratogénicas. Sin embargo, el mayor problema se atribuye a los daños de los diversos órganos y sistemas de los animales, implicando la reducción del rendimiento productivo de los mismos (Mallmann et al., 2007).

“Numerosos autores coinciden, que la principal estrategia para evitar las micotoxinas en los alimentos es la prevención. Por lo que se debe implantar un sistema integrado basado en el empleo de especies vegetales resistentes; fungistáticos, fungicidas, descontaminación e insecticidas; Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (APPCC) en las fases de producción, transporte, almacenamiento, comercio y preparación de los alimentos que se destinan a las aves de producción; gestión de buenas prácticas agrícolas y buenas prácticas de procesamiento o manufacturación”.

Los principales productos que participaron en la formación del valor bruto de la producción avícola (VBPA) en el mes de Julio del 2018, fueron: carne de pollo (79,8 %), huevo de gallina para consumo (14,7 %), carne de gallina de ponedoras y reproductoras (3,8 %), carne de pavo (1,6 %) y carne de pato (0,2 %). En el mes de Julio, la producción de carne de pollo bordeó las 139 mil toneladas, presentando un incremento de 4,6 % con relación al similar mes del año 2017; ello debido a la mayor colocación de pollitos bebe durante los meses de Mayo (7,5 %) y Junio (6,3 %). En lo que va del año 2018, la producción de carne viene mostrando un incremento de 8,9 %, comparado con similar periodo del año anterior (Contreras y Osorio, 2018).

“Por la importancia de la producción avícola como fuente de alimento para la población humana, es necesario conocer los niveles de micotoxinas que ingieren con el alimento para tomar medidas preventivas y eliminarlas o neutralizarlas, previniendo problemas en salud animal y salud pública”.

1.1. Situación problemática

“En el año 2017, Perú fue el país con mayor consumo per cápita de pollo en Latinoamérica, con 46,66 kg por año, seguido de Argentina (44), Bolivia (43), Brasil y Panamá (42). Así consta en la base de datos de empresas líderes avícolas de WATT Global Media” (Ruiz, 2018).

La provincia de Chíncha del departamento de Ica, cuenta con molinos en los distritos de “Alto Laran, Grocio Prado, Sunampe, Chíncha Alta y Pueblo”; los cuales no son monitoreados para la detección y cuantificación de micotoxinas en los insumos que se emplean para la alimentación de la población avícola.

“En la ciudad de Lima, se analizaron los resultados de las muestras de torta de soya procedentes de Paraguay, Argentina, Brasil y Estados Unidos; resultando positivas para OTA y toxina T – 2, 46/64 (71,9 %) y 128/144 (88,9 %) respectivamente; sin embargo, el 100 % de las muestras no sobrepasaron los niveles máximos permitidos (NMP) de 0,250 partes por millón (ppm), según las recomendaciones de la Comisión Europea” (Castro, 2015).

La AFB₁, se clasifica como carcinogénesis del grupo 1 y es un “factor de riesgo para el desarrollo del carcinoma hepatocelular” (IARC 2012). Además, la exposición a la aflatoxina sinergia con la infección crónica por el “virus de la hepatitis B” y aumenta el riesgo de cáncer de hígado (Liu et al. 2012). La exposición a aflatoxinas en la dieta también puede afectar el sistema inmunitario y causar daño hepático y renal (Mulder et al. 2015).

La OTA, ha sido clasificada dentro del grupo 2B como potencialmente carcinogénesis, genotóxica y teratogénesis para los humanos. La exposición a bajas concentraciones en animales domésticos y experimentales conduce a alteraciones morfológicas y funcionales en los tejidos renales y hepáticos (Malir et al., 2013).

La toxina T – 2 como contaminante en la alimentación de los pollos, exhiben lesiones oral y gastrointestinal, que repercute en el menor consumo de alimento y disminución del peso corporal (Königs et al., 2009). El hígado es el principal órgano tóxico de la toxina T – 2 (Medina et al., 2010).

Por lo que se hace necesario en nuestro país, contar con información referente a los niveles de micotoxinas que presentan los insumos utilizados en la formulación de alimentos para la producción avícola, considerando como NMP para AFB₁ de 10 partes por billón (ppb), 50 ppb para OTA y 150 ppb para toxina T – 2 (Gimeno, 2010).

Mediante los resultados de los valores de micotoxinas en soya, podemos tomar medidas adecuadas y oportunas para prevenir alteraciones negativas en la salud animal y en la salud humana, como lo realizado en China, con respecto al cáncer de hígado, que es uno de los cánceres más comunes en este país; donde los principales factores de riesgo son las infecciones crónicas del virus de la hepatitis B (VHB), el virus de la hepatitis C (VHC) y la alta exposición a las aflatoxinas. Además, se reconoce que la exposición a cianotoxinas y algunos comportamientos de salud prevenibles contribuyen al desarrollo del cáncer de hígado. En un consenso de expertos (2018), recomiendan las siguientes "Estrategias de prevención primaria del cáncer de hígado" a nivel nacional: Inmunización con vacunas contra el VHB, incluidos en los programas inmunitarios para recién nacidos, bebés y niños nacidos

de madres con diferentes estados de infección por VHB; tratamientos antivirales para pacientes con hepatitis B crónica o hepatitis C; evitar o reducir la exposición a las aflatoxinas, así como a las cianotoxinas; cambiar el estilo de vida dañino, incluyendo dejar de fumar y limitar el consumo de alcohol, etc. (Zhonghua, 2018).

1.2. Formulación del problema

“¿Cuáles son los valores de micotoxinas obtenidos por el método de ELISA en soya para aves en producción en la Provincia de Chíncha en el año 2016?”.

1.3. Justificación teórica

La determinación de micotoxinas en la soya, que sirve de alimento para aves en producción, permitirá conocer la magnitud del riesgo para la micotoxicosis aviar y por ende micotoxicosis en salud pública, con el propósito de tomar medidas oportunas para prevenir los efectos indeseables, generando mayor productividad, menores costos de producción y ventas de productos avícolas al alcance de la población de menores recursos económicos; además minimizar el riesgo de la salud por residuos de micotoxinas, considerando que la “principal alteración de la salud humana y animal, esta relacionado con exposición crónica que inducen al cáncer, toxicidad renal y inmunosupresión” (Bennet y Klich, 2003).

1.4. Justificación práctica

Los resultados del estudio servirán como referencia al Servicio Nacional de Sanidad Agraria (SENASA) – ICA, para implementar un monitoreo continuo de los insumos que se emplean para la alimentación de las aves de producción.

Para la ejecución de la investigación se contó con el apoyo de la “Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional San Luis Gonzaga de Ica” y SENASA – Chíncha.

1.5. Objetivos

1.5.1. Objetivo general

“Determinar los valores de micotoxinas por el método de ELISA en soya para aves en producción en la provincia de Chincha en el año 2016”.

1.5.2. Objetivos específicos

1.5.2.1. Determinar el valor de Aflatoxina B₁ en soya para aves en producción.

1.5.2.2. Determinar el valor de Ocratoxina A en soya para aves en producción.

1.5.2.3. Determinar el valor de toxina T – 2 en soya para aves en producción.

CAPÍTULO 2: MARCO TEÓRICO

2.1. Marco filosófico o epistemológico de la investigación

Según la OMS (Diciembre, 2015), “el acceso a alimentos inocuos y nutritivos en cantidad suficiente es fundamental para mantener la vida y fomentar la buena salud. Los alimentos insalubres que contienen bacterias, virus, parásitos o sustancias químicas nocivas causan más de 200 enfermedades, que van desde la diarrea hasta el cáncer. Se estima que cada año enferman en el mundo unos 600 millones de personas, de los cuáles casi 1 de cada 10 es por ingerir alimentos contaminados y que 420 000 mueren por esta misma causa, con la consiguiente pérdidas de 33 millones de años de vida ajustados en función de la discapacidad (AVAD). Los niños menores de 5 años, soportan un 40 % de la carga atribuible a las enfermedades de transmisión alimentaria, que provocan cada año 125 000 defunciones. Las infecciones diarreicas, que son las más comúnmente asociadas al consumo de alimentos contaminados, hacen enfermar cada año a unos 550 millones de personas y provocar 230 000 muertes. La inocuidad de los alimentos, la nutrición y la seguridad alimentaria están relacionados. Los alimentos insalubres generan un círculo vicioso de enfermedad y mal nutrición, que afecta especialmente a los lactantes, los niños pequeños, los ancianos y los enfermos”. ETAs obstaculizan el desarrollo económico y social, perjudicando la economía nacional, turismo y el comercio. En la actualidad, las cadenas de suministro de alimentos atraviesan numerosas fronteras nacionales. La buena colaboración entre los gobiernos, los productores y los consumidores contribuye a garantizar la inocuidad de los alimentos.

Las ETAs son generalmente de carácter infeccioso o tóxico y son causadas por bacterias, virus, parásitos o sustancias químicas que penetran en el organismo a través del agua o los alimentos contaminados. “La contaminación por sustancias químicas puede provocar intoxicaciones agudas o enfermedades crónicas como el cáncer. Entre las sustancias químicas con mas riesgos para la salud, son las toxinas naturales: micotoxinas, biotoxinas marinas, glucósidos cianogénicos y toxinas de las setas venenosas. Los alimentos básicos como el maíz o los cereales pueden contener elevados niveles de micotoxinas, como la aflatoxina y la ocratoxina, los cuales en una exposición prolongada, pueden afectar al sistema inmunitario, al desarrollo normal o causar cáncer” (OMS, 2015).

Por lo que en el presente estudio con la determinación de micotoxinas (AFB₁, OTA y toxina T – 2) por ELISA en soya destinadas a la alimentación de “aves en producción en la provincia de Chíncha”, se evidenció su presencia y magnitud para tomar medidas oportunas, y prevenir micotoxicosis en animales y humanos.

Con el suministro de alimentos inocuos se contribuye al bienestar de los animales y humanos y sirve de base para el desarrollo sostenible.

“En la segunda conferencia internacional FAO/OMS sobre nutrición, celebrada en Roma en noviembre del 2014, se reiteró la importancia de la inocuidad de los alimentos para lograr una mejor nutrición humana a través de una alimentación sana y nutritiva. La mejora de la inocuidad de los alimentos es la clave para un desarrollo sostenible del hombre” (FAO y OMS, 2014).

2.2. Antecedentes de la investigación

“Se reporta, la presencia de aflatoxinas (AFs) en el 50 % (14/28) de muestras de soya recién cosechada, las cuales se encontraban altamente contaminadas con hongos debido al exceso de lluvia que recibieron las plantas durante su crecimiento. Aparte de este único reporte, la mayoría de publicaciones sobre este tema se refieren a la presencia de micotoxinas en soya almacenada” (Bean et al, 1972).

“Se considera que la soya es un sustrato pobre para la producción de AFs, de acuerdo a los siguientes reportes: En Estados Unidos (1969), se analizaron 866 muestras de las cosechas de 1964 y 1965, de los cuales sólo el 0,2 % (2/866), contenían 7 y 10 ppb de AFs respectivamente” (Shotwell et al, 1969); en 1977, se analizaron 180 muestras de la cosecha del año, 1975 y no se detectaron AFs, OTA ni zearalenona (ZEN) (Shotwell et al, 1977). “En Argentina (1991), se procesaron 94 muestras, durante las cosechas de 1986 y 1987, de los cuales el 9,6 % (9/94) con trazas – 36 ppb de aflatoxinas” (Fernandez Pinto et al, 1991). Egipto (1993), analizaron 100 muestras con resultados negativos para (OTA, esterigmatocistina, toxina T – 2 y ZEN) y el 35 % positivos a AFs con niveles de 5 – 35 ppb (Gonzalo y Diaz, 1995).

En Brasil, se recolectaron muestras de lotes comerciales en cuatro estados brasileños. De acuerdo con el sistema de clasificación comercial de la soya, tenemos: granos

enteros (WK), los núcleos partidos, rotos y triturados (SBCK), los granos dañados (DK), granos dañados por el calor y quemados (HDBK), granos con moho (MK), granos verdosos (GK) y material mas impurezas extrañas (FMI); se analizaron utilizando “cromatografía líquida de alto rendimiento con detección de fluorescencia (HPLC – FLD)”. AFB₁ y ZEN dieron positivo en 43,3 y 80 %, respectivamente. La incidencia de AFB₁ fue mayor en MK (50 %), seguida de HDBK (30,4 %) y FMI (26 %). La incidencia de ZEA varió de 69 % (SBCK) a 100 % (HDBK) (Calori et al., 2018).

En el Estado de Zulia, Venezuela (2000), de un molino ubicado en el Municipio de Mara, se analizaron 40 muestras de 5 insumos (harina de maíz, harina de soya, maíz amarillo molido, sorgo molido y afrechillo de trigo), que se emplean para la elaboración de alimentos balanceados para aves con el objetivo de identificar y cuantificar los niveles de AFB₁, considerando los NMP de 20 ppb. El 43 % (17/40) de las muestras resultaron positivas. El contenido promedio para la harina de maíz (\bar{X} = 34,1 ppb), por encima de los NMP, y para el resto fue significativamente menor: harina de soya (\bar{X} = 2 ppb), maíz amarillo molido (\bar{X} = 0,98 ppb), sorgo molido (\bar{X} = 0,25 ppb) y afrechillo de trigo (\bar{X} = 0,0 ppb). Mediante la prueba Tukey se determinó que la única media estadísticamente diferente fue la harina de maíz (Fernandez Surumay et al., 2000).

“En gallinas, la reducción de la producción de huevos está precedida por la reducción en los niveles sanguíneos de proteínas y lípidos. Las ponedoras que consumen una dieta con 5 000 ppb de aflatoxinas durante 4 semanas, pueden reducir la producción de huevos a partir del octavo día, llegando a una reducción del 35 %, una semana luego de la retirada de la micotoxina de la dieta” (Rosa et al., 2001).

“En reproductoras, además, se reduce el tamaño de los huevos y la proporción del tamaño de las yemas; sin embargo, la deposición de la cáscara de los huevos no se ve afectada y aumenta el espesor de la cáscara, afectando la eclosionabilidad, debido a la reducción de los intercambios gaseosos entre el embrión y el ambiente” (Mallmann et al., 2007). “La AFB₁, es biotransformada en el hígado, teniendo como uno de sus principales metabolitos la AFM₁, que es eliminada del organismo a través

de la yema; además, la propia AFB₁ y el aflatoxicol también pueden encontrarse en la yema a partir de las 24 horas posteriores a la ingestión de aflatoxinas; los cuales pueden causar mortalidad embrionaria, los picos de mortalidad embrionaria ocurren en el tercio final de la incubación, pues los metabolitos de las aflatoxinas están concentrados en la yema, la que es utilizada por el embrión como fuente energética en este período del proceso de incubación” (Mallmann et al., 2007).

Se recolectaron 32 muestras de hígados (normales y sospechoso de micotoxicosis) de 16 mercados de diferentes sectores socio económicos de Lima; las muestras se pasaron por la columna de inmunoafinidad para AFB₁ y para su detección se empleó el método de ELISA, con el límite de detección de 0,5 ppb. En los resultados no se detectó AFB₁ y se asume que los hígados sospechosos, podrían tener origen de otros procesos metabólicos y que la presencia de secuestrantes en los alimentos de pollos tiene buen efecto (Arbaiza et al., 2009).

En Japon, AFB₁, con 3 000 ppb como contaminante en la alimentación de patos, gallinas ponedoras, codornices y pollos broiler; al octavo y decimo primer día se sacrificaron los animales y fueron analizadas mediante HPLC, siendo los tejidos de los codornices con más alto nivel de AFB₁ y en todas las especies mencionadas, la AFB₁ fue diez veces más alta en el hígado que en el músculo (Bintvihok et al., 2002).

AFB₁, con 70 ppb, en el alimento de 120 pollos de engorde machos del híbrido comercial Hubbar x Hubbar, durante 42 días, no afectaron significativamente los promedios de los pesos y no se observaron lesiones macroscópicas en los hígados; sin embargo, microscópicamente, los hígados presentaron lesiones hepatotóxicas de leve a moderada y en algunos casos lesiones características de micotoxicosis hepática leve (proliferación y dilatación de conductos biliares); y en lo referente a la actividad enzimática sérica de la alanino aminotransferasa (ALT), no se alteró significativamente, pero sí disminuyó la actividad sérica del aspartato aminotransferasa (AST), con $p < 0,05$ (Arrieta et al., 2006).

Se evaluaron los parámetros productivos y reproductivos de reproductores pesados de pollos de la línea Ross 308, considerando 240 hembras y 32 machos, distribuidos en 4 tratamientos con 4 replicas, 15 hembras y 2 machos por replica. Entre las

semanas 61 – 68, se alimentaron, T1: dieta base sin AFB₁ y T2, T3 y T4: dieta más 250, 500 y 750 ppb de AFB₁ respectivamente, y de la 69 – 72, todos los tratamientos recibieron dietas sin AFB₁. Los resultados, indican que los niveles de AFB₁ utilizados no influyeron en los parámetros productivos: peso corporal, producción de huevo, peso y gravedad específica de los huevos; tampoco afectó los parámetros reproductivos: incubabilidad y calidad de los pollitos bebé (Utt Patel et al., 2014).

“Según estudios realizados en Inglaterra, las ocratoxinas parecen ser las micotoxinas mas importantes de la soja y sus subproductos; con 19 – 36 % y niveles de 50 a 500 ppb de OTA han sido reportados (cuadro 1)” (Gonzalo y Diaz, 1995).

Cuadro 1. “Ocurriencia natural de OTA en frijol soja y productos de soja”

Sustrato	Número de muestras			Rango (ppb)
	Analizadas	Positivas	%	
Frijol soja	25	9	36,0	50 – 500
Harina de soja	21	4	19,0	50 – 500
Productos de soja	28	6	21,4	50 – 500

Fuente: Adaptado del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 1980.

“Se reportan, los resultados de 64 muestras de torta de soja durante los años 2007 a 2011, que ingresaron al Perú procedente de Paraguay, Argentina, Brasil y Estados Unidos; siendo positivos a OTA, 46/64 (71,9 %) con $\bar{x} \pm D. S.$ ($1,99 \pm 1,63$) y con rango mínimo y máximo de 0,02 – 5,99 ppb (Castro et al., 2015); sin embargo, el 100 % de las muestras no sobrepasaron los NMP (100 ppb), según las recomendaciones de la Comisión de las Comunidades Europeas”.

En el examen *post mortem* de pollos de engorde con niveles alimentarios de 300 a 16 000 ppb de OTA, se encontraron riñones inflamados y pálidos (Fink, 1999). “Las aves más jóvenes parecen ser más susceptibles a la OTA que las aves más viejas ya que los pollos de engorda de tres semanas tienen valores de LD50 más altos que los pollos de un día de edad” (FAO, 2003).

Para el efecto individual y sinérgico entre la AFB₁ y OTA; se evaluaron, 80 pollos machos de la línea Ross a partir del primer día de edad y separados en 4 tratamientos

con 4 réplicas de 5 aves por réplica, hasta los 21 días. AFB₁ con 340 ppb no es tóxica y OTA con 850 ppb, ocasionan mayor peso del hígado, mayor nivel de glucosa (menor ingreso de glucosa a los tejidos), nivel más alto de triglicéridos (podría relacionarse con alteraciones cardiovasculares), menor peso de los órganos linfoides: bazo y timo (posible atrofia), con alto valor de proteína total (compatible con cuadro inflamatorio), menores ganancias de pesos, mayores pesos de los riñones, mayores niveles de ácido úrico (falla renal para eliminar los desechos metabólicos), posible alteración hepática (por niveles bajos de colesterol), lesiones significativas en hígado, riñones y proventrículo. Sin embargo, la concentración de OTA es 2,5 más que la AFB₁ y además no se observa el efecto sinérgico (Fierro, 2008).

Se reporta el efecto sinérgico entre las combinaciones puras de AFB₁ (2 500 ppb) y OTA (2 000 ppb); sin embargo, con AFB₁ (250 ppb) y OTA (250 ppb), no afectan los parámetros productivos en las aves durante un periodo de 21 días (Fierro, 2008).

“*Fusarium sporotrichioides* inoculado en soya, sintetizaron: toxina T – 2 y HT – 2, que se evidencia en el cuadro 2” (Mallmann et al., 2007).

Cuadro 2. “Producción de micotoxinas de *Fusarium sporotrichioides* en soya”

Soya	Humedad (%)	T – 2 (ppm)	HT – 2 (ppm)
Frijol entero	33	32	49
	50	37	80
	60	17	109
Frijol partido	33	71	111
	50	17	71
	60	15	46
Torta	33	103	285
	50	110	284
	60	92	439

Fuente: Mallmann et al., 2007.

En la provincia de Córdoba (Argentina) se analizaron muestras de soya y harina de soya recolectadas durante la temporada de cosecha del 2008 y 2009, para detectar

toxinas T – 2 y HT – 2, usando columna de inmunoadfinidad y HPLC con detección de fluorescencia. Los límites se definieron mediante la prueba de recuperación con muestras de harina de soya y soya enriquecida. Recuperaciones medias para T – 2 dentro del rango de picos 125 – 500 g/K, fueron 90,9 y 81,3 % para la soya y la harina de soya, respectivamente, con desviación estándar relativa menor al 10 %. El análisis de muestras enriquecidas con HT – 2 en el mismo rango dieron una recuperación media de 70,2 y 77,5 % para la soya y la harina de soya, respectivamente, con desviaciones estándar relativas menor al 12 %. El límite de detección para el método fue de 25 g/kg para T – 2 y HT – 2, basado en una relación señal/ruido de 3:1 y el límite de cuantificación se estableció como tres veces el límite de detección. De 64 muestras, solo dos muestras de soya mostró contaminación con tricotecenos tipo A, confirmadas por cromatografía líquida – espectrometría de masas (LC – MS). Este estudio demostró bajas incidencias de los niveles de T – 2 y HT – 2 en soya (Barros et al., 2011).

“Se analizaron, los resultados de 144 muestras de torta de soya, entre los años (2007 – 2011), que ingresaron al Perú procedente de Paraguay, Argentina, Brasil y Estados Unidos; siendo positivos a toxina T – 2: 128/144 (88,89 %) con $\bar{x} \pm D. S.$ (12,96 \pm 9,97) y con rango mínimo y máximo de 0,08 – 47,33 ppb (Castro et al., 2015); sin embargo, el 100 % de las muestras no sobrepasaron los NMP”.

Mallmann (2007), “reporta que gallinas de postura comercial con 2 ppm de toxina T – 2 en su alimentación, se producen lesiones orales en aproximadamente el 50 % de los lotes, disminuyendo paralelamente la producción de huevos. En pollos de engorde con 1 ppm se producen lesiones orales y con 4 ppm presentan bajo consumo, retardo en el crecimiento, alteraciones hematológicas y neurotoxicidad”.

2.3. Bases teóricas

2.3.1. Micotoxinas

“Las micotoxinas, son metabolitos secundarios que se forman al principio de la fase estacionaria o al final de la fase exponencial del crecimiento del moho; son compuestos policetónicos, de bajo peso molecular, generalmente entre 300 a 400 daltons, generados de las reacciones de condensación en la que se interrumpe la reducción de los grupos cetónicos en la biosíntesis de los ácidos grasos, utilizados por los mohos como fuentes de energía” (Gimeno y Martins, 2011).

“Los principales hongos contaminantes de alimentos son miembros de los géneros: *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*” (Marin et al., 2013).

Mientras que las especies de *Aspergillus* y *Penicillium* crecen frecuentemente en alimentos en condiciones de almacenamiento, las especies de *Fusarium* a menudo infectan cultivos en crecimiento como el trigo, cebada y maíz en el campo y se propagan en la planta. Por lo que, la contaminación por micotoxinas puede ocurrir antes de la cosecha cuando la planta de cultivo está creciendo o después de la cosecha durante el procesamiento, envasado, distribución y almacenamiento de productos alimenticios (Pereira et al., 2014).

La contaminación por micotoxinas de los alimentos es una preocupación mundial constante, incluso con buena condiciones de agricultura, almacenamiento y procesamiento; lo que representa un desafío difícil para la seguridad alimentaria. Adicionalmente, muchas micotoxinas no se eliminan fácilmente durante el procesamiento de alimentos debido a su estabilidad frente a tratamientos térmicos, físicos y químicos (Marin et al., 2013). Además, las micotoxinas también pueden llegar a la población humana a través de productos animales tales como carne, huevos, leche como resultado de que el animal ingiera alimentos contaminados con micotoxinas (Kaushik, 2015).

Las micotoxinas mediante el contacto directo e inhalación representan rutas menores de exposición, mientras que la mayoría de la exposición humana ocurre a través de la dieta a través de la ingesta de alimentos contaminados. De hecho, se estima un 25 %

de la oferta mundial de cereales estan contaminados con micotoxinas (Tran et al., 2012).

La exposición a las micotoxinas puede contribuir a una variedad de efectos adversos para la salud, como efectos hepatotóxicos, nefropatía, carcinogénesis, citotóxicos, inmunosupresores, inflamatorios, neurológicos, estrogénesis y/o teratogénesis (Fromme et al., 2016).

Las micotoxinas que regularmente contaminan los alimentos y los piensos son AFs, OTs, fumonisinas, patulina, ZEN y tricotecenos, incluyendo el deoxynivalenol (DON) y la toxina T – 2 (Pereira et al., 2014).

En el cuadro 3, se evidencian las principales micotoxinas, los principales productores y algunos productos alimenticios comúnmente contaminados junto con los límites reglamentarios para micotoxinas en alimento y piensos por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) de los EE. UU. y de la Union Europea (UE).

Cuadro 3. Principales micotoxinas y límites en los niveles en la alimentación animal, según la USFDA y la UE

Micotoxinas	Especies de hongos	Productos alimenticios	USFDA µg/kg	EU µg/kg
Aflatoxinas B ₁ , B ₂ , G ₁ , G ₂	<i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus parasiticus</i>	Maíz, trigo, arroz, cacahuete, sorgo, pistacho, almendra, nueces de tierra, nueces de árbol, higos, semillas de algodón, especias	20 para total	2 – 12 para B ₁ 4 – 15 para total
Aflatoxina M ₁	Metabolito de Aflatoxina B ₁	Leche, productos lácteos	0,5	0,05 en leche 0,025 en fórmulas infantiles y leche infantil
Ocratoxina A	<i>Aspergillus ochraceus</i> <i>Penicillium verrucosum</i> <i>Aspergillus carbonarius</i>	Cereales, frutos secos de vid, vino, uvas, café, cacao, queso	No establecido	2 – 10
Fumonisinias B ₁ , B ₂ , B ₃	<i>Fusarium verticillioides</i> <i>Fusarium proliferatum</i>	Maíz, productos de maíz, sorgo, espárragos	2 000 – 4 000	200 – 1 000
Zearalenona	<i>Fusarium graminearum</i> <i>Fusarium culmorum</i>	Cereales, productos de cereales, maíz, trigo, cebada	No establecido	20 – 100
Deoxynivalenol	<i>Fusarium graminearum</i>	Cereales, productos de cereales	1 000	200 – 50
Patulina	<i>Penicillium expansum</i>	Manzanas, jugo de manzana y concentrado	50	10 – 50

Fuente: Alshannaq y Hyuk, 2017.

2.3.1.1. “Factores condicionantes para el desarrollo de los hongos y producción de micotoxinas”

“Para el crecimiento de los hongos y la producción de micotoxinas existen tres factores fundamentales que son condicionantes” (Gimeno y Martins, 2011):

2.3.1.1.1. Factores físicos

2.3.1.1.1.1. Humedad y Actividad del agua.

“La cantidad de agua existente en el ambiente y en los sustratos, es uno de los factores importantes para el desarrollo de los hongos y para la producción de micotoxinas. Sin embargo no sólo influye la cantidad de agua sino también la forma de presentación de la misma, así pues, el agua se encuentra en forma libre y en forma combinada” (Barreiro, 2008).

“El agua libre existe dentro y alrededor de los tejidos vegetales o de las células y puede ser eliminada sin interferir seriamente con los procesos vitales. La forma combinada está presente en los tejidos vegetales y animales, formando parte integrante de las células que los componen y en unión con las proteínas y glúcidos” (Barreiro, 2008).

“Para la germinación de las esporas de hongos, es necesario que el agua se encuentre en forma libre” (Gimeno y Martins, 2011).

- **Humedad relativa de equilibrio (HRE):** es la cantidad de humedad de la que disponen los microorganismos una vez alcanzado el equilibrio entre la humedad libre del producto y el vapor de agua existente en el medio ambiente que lo rodea. La HRE se expresa en porcentaje y varía de unos alimentos a otros conforme a su riqueza en glúcidos o en materia grasa (Gimeno y Martins, 2011).
- **Actividad del agua** “es la relación existente entre el agua libre en los alimentos y la capacidad de los microorganismos para allí proliferar. La *aw* nos indica cuál es la cantidad de agua disponible para el desarrollo de los microorganismos una vez que se ha alcanzado el equilibrio hídrico en el sistema alimento/medio ambiente” (Quinta, 1982).

“La a_w se expresa como la relación existente entre la tensión del vapor de agua en el sustrato (P) y la del agua pura (P_0), a la misma temperatura, ($a_w = P/P_0$). Si la humedad del alimento está en equilibrio con la HRE de la atmósfera que lo rodea, la a_w en el alimento es numéricamente equivalente a esta, ($a_w = HRE/100$)” (Quinta, 1982).

“Tengamos en cuenta que la HRE se refiere a la atmósfera en equilibrio con el producto y la a_w se refiere al propio producto. El agua pura tiene una a_w de 1 y está en equilibrio con una atmósfera de 100 % de HRE. La a_w de un alimento es siempre menor que 1” (Gimeno y Martis, 2011).

“Los valores de a_w que los diversos grupos de hongos necesitan varían de acuerdo con el sustrato y la temperatura. Los valores de a_w necesarios para el desarrollo de algunos hongos y para la producción de micotoxinas se evidencian en el cuadro 4” (Quinta, 1982).

Cuadro 4. “Valores de a_w necesarios para el desarrollo de algunos mohos y para la producción de algunas micotoxinas”.

Mohos	a_w	Micotoxinas	a_w
<i>Aspergillus flavus</i>	0,78	Aflatoxinas	0,83
<i>Aspergillus parasiticus</i>	0,70	Aflatoxinas	0,80
<i>Penicillium expansum</i>	0,85	Patulina	0,99
<i>Penicillium patulum</i>	0,83	Patulina	0,95
<i>Aspergillus clavatus</i>	0,85	Patulina	0,99
<i>Aspergillus ochraceus</i>	0,77	Ocratoxinas	0,88
<i>Aspergillus ochraceus</i>	0,77	Ácido penicílico	0,90
<i>Penicillium cyclopium</i>	0,82	Ocratoxinas	0,90
<i>Penicillium viridicatum</i>	0,83	Ocratoxinas	0,90
<i>Penicillium citrinum</i>	0,80	Citrinina	0,88
<i>Penicillium martensii</i>	0,79	Ácido penicílico	0,99

Fuente: (Quinta, 1982).

“La mayor parte de los hongos se desarrollan a partir de valores de a_w de 0,70 y en general es raro que haya hongos que germinen con valores de a_w entre 0,60 y 0,70. Es de destacar que las bacterias por regla general no crecen con valores de a_w por debajo de 0,90” (Quinta, 1982).

“La influencia del factor a_w en el metabolismo de las micotoxinas solo está suficientemente estudiado para las AFs, OTs, ácido penicílico y patulina. Sin embargo la producción de micotoxinas es nula o muy baja con a_w inferior a 0,80 y no obstante el crecimiento de mohos toxicogénicos ya se puede producir en un intervalo de a_w de 0,70 a 0,85” (Gimeno y Martins, 2011).

“Aunque el valor porcentual de humedad libre de un alimento solo nos da una orientación para juzgar las posibilidades de crecimiento y multiplicación de los hongos; los valores de humedad inferiores al 13 % suelen presentar un crecimiento y proliferación fúngica bajos y a medida que la humedad aumenta, el crecimiento y proliferación fúngicas se aceleran, pudiendo ser de forma exagerada para valores de humedad del 16 %” (Gimeno y Martins, 2011).

2.3.1.1.1.2. Temperatura (T°)

“La temperatura óptima para el desarrollo de los hongos se encuentra entre 25 y 30 °C y el límite máximo entre 40 y 45 °C. La mayor parte de los hongos no crecen por debajo de 5 °C, sin embargo, hay hongos como el *Aspergillus flavus*, *Aspergillus candidus* y *Aspergillus fumigatus* que pueden crecer sin problemas hasta los 55 °C y otros como el *Penicillium expansum* y el *Penicillium cyclopium*, son capaces de crecer a 0 °C. Temperatura mínima necesaria para el desarrollo de algunos mohos y para la producción de Micotoxinas se evidencia en el cuadro 5” (Gimeno y Martins, 2011).

Cuadro 5. “Temperatura mínima necesaria para el desarrollo de algunos mohos y para la producción de algunas micotoxinas”.

Mohos	°C	Micotoxinas	°C
<i>Aspergillus flavus</i>	10	Aflatoxinas	10
<i>Aspergillus clavatus</i>	10	Patulina	12
<i>Aspergillus ochraceus</i>	10 – 12	Ocratoxina	12
<i>Penicillium expansum</i>	0	Patulina	0 – 24
<i>Penicillium cyclopium</i>	0	Ocratoxina	0 – 24
<i>Penicillium cyclopium</i>	0	Acido penicílico	4
<i>Fusarium roseum</i>	15	Zearalenona	10

Fuente: (Gimeno y Martins, 2011).

“Combinación de T° y aw para el crecimiento de algunos mohos y la producción de micotoxinas (Cuadro 6)” (Hesseltine, 1976).

Cuadro 6. “Temperatura y aw exigidas para el desarrollo de algunos mohos y para la producción de algunas micotoxinas”.

Mohos	Crecimiento		Micotoxinas	Producción	
	T° (°C)	Aw		T° (°C)	Aw
<i>Aspergillus flavus</i>	10	0,78	Aflatoxinas	10 – 25	0,83
<i>Aspergillus clavatus</i>	10	0,85	Patulina	12	0,83
<i>Aspergillus ochraceus</i>	10 – 12	0,77	Ochratoxinas	12	0,99
<i>Penicillium expansum</i>	0	0,85	Patulina	0 – 24	0,99
<i>Penicillium cyclopium</i>	0	0,82	Ocratoxinas	4 – 31	0,90

Fuente: (Hesseltine, 1976).

“Existe en algunos casos una proximidad entre la temperatura mínima necesaria para el crecimiento del moho y la que se precisa para la producción de la micotoxina y en general también sucede con la temperatura óptima. Sin embargo hay algunas excepciones, así tenemos que, *Aspergillus flavus* crece en el arroz entre 6 a 45 °C con un óptimo a 37 °C y la producción de aflatoxina se efectúa entre 11 y 36 °C con un máximo de producción de 30 °C” (Hesseltine, 1976).

“Con una aw de 0,85 a 20 °C que aproximadamente puede corresponder a una humedad en el sustrato de 15 a 16 %, las esporas fúngicas germinan en 5 a 12 días,

en cambio con una aw de 0,75 (que corresponde aproximadamente al 13 – 14 % de humedad en el sustrato) a la misma temperatura, las esporas fúngicas tardan en germinar de 4 a 12 semanas. Sin embargo, las cosas pueden variar significativamente si especificamos el tipo de semilla. Así, la HRE varía de acuerdo al tipo de semilla, conforme ésta sea amilácea o bien oleaginosa. Relación entre la humedad de varios cereales y semillas con diferentes HRE dentro de un mismo intervalo de temperatura (Cuadro 7)” (Mirocha, 1977).

Cuadro 7. “Relación entre la humedad de varios cereales y oleaginosas con diferentes HRE entre 25 y 30 °C”.

HRE %	Maíz Trigo, Sorgo	Soja Integral	Girasol Integral
65	12,5 – 3,5	11,5	8,5
70	13,5 – 14,5	12,5	9,5
75	14,5 – 15,5	13,5	10,5
80	15,5 – 16,5	16,0	11,5
85	18,0 – 18,5	18,0	13,5

Fuente: Mirocha, 1977.

“Dentro del intervalo de temperatura de 25 – 30 °C, los granos de cereales (maíz, trigo y sorgo) mantenidos en estado de equilibrio a un nivel de humedad de 13 % o menos (lo que correspondería a una humedad relativa de equilibrio del 65 %), se pueden almacenar con seguridad durante un tiempo indefinido. Para la soya y para el girasol integral (semilla de girasol), donde un 13 % de humedad en estado de equilibrio correspondería a una HRE de casi 85 %. Cualquier semilla almacenada en estado de equilibrio con una HR por debajo de 65 %, ésta muy segura de no ser invadida por hongos propios. Cereales como el trigo, maíz y sorgo con niveles de humedad de 13,5 a 14 % serán invadidos por hongos tales como *Aspergillus restrictus* y *Aspergillus halophilicus*. Si la humedad fuera de 15 % o más, la invasión fúngica más común sería por *Aspergillus glaucus*” (Mirocha, 1977).

2.3.1.1.1.3. Zonas de microflora

“En un silo pueden existir pequeñas zonas del alimento con alto contenido en humedad susceptibles de desencadenar un desarrollo fúngico, lo cual puede después provocar un aumento general de humedad en el sustrato y consecuentemente una

mayor contaminación fúngica y predisposición para la producción de micotoxinas” (Gimeno y Martins, 2011).

“En verano, el aire que rodea al grano almacenado en un silo tiene una temperatura más elevada en la zona periférica que en la zona central. El aire frío de la zona central desciende y el aire caliente de la zona periférica absorbe humedad y asciende, creándose de esta forma unas corrientes de convección. El aire frío en su desplazamiento provoca una depresión que obliga a que el aire caliente y cargado de humedad, una vez alcanzado la parte superior del silo, descienda hacia la zona central. De esta forma se condensa la humedad en aquella zona de contacto del aire caliente con las zonas centrales más frías” (Gimeno y Martins, 2011).

“En invierno, ocurre lo contrario, el aire de la zona central tiene una temperatura más elevada que el de la periferia. De esta forma el aire de la zona central, al estar más caliente, tiene una mayor capacidad de saturación y por lo tanto absorbe humedad. Este aire más caliente, asciende por ser más ligero y el de la periferia desciende por ser frío y más denso, creándose de esta forma unas corrientes de convección. El aire que está caliente y cargado de humedad, cede ésta al ponerse en contacto con las zonas superiores más frías, debido a que pierde calor y su capacidad de saturación disminuye” (Gimeno y Martins, 2011).

“Estas migraciones de humedad que sufren las materias primas y piensos en los silos de almacenamiento tiene una importancia decisiva en el desarrollo fúngico y en la posible producción de micotoxinas” (Gimeno y Martins, 2011).

“No está de más advertir sobre el cuidado que se debe tener en lo que respecta a las infiltraciones de humedad en los silos durante los días lluviosos” (Gimeno y Martins, 2011).

2.3.1.1.1.4. Integridad física de los granos

“Los tegumentos intactos del grano dificultan el acceso del hongo al almidón endospermico. Los granos partidos son más susceptibles de invasión y desarrollo fúngico, que los granos enteros. Debido a un aumento de la superficie de cultivo y

una mayor predisposición para que el hongo contacte con la parte interna del grano” (Gimeno y Martins, 2011).

2.3.1.1.2. Factores químicos

2.3.1.1.2.1. pH.

“Los hongos toleran un gran intervalo de pH (2,5 – 7,5), de un modo general soportan mejor el medio ácido que el alcalino. Es de destacar que ellos mismos son capaces de alterar el pH, utilizando como fuente de energía los ácidos orgánicos del alimento o los excretados por bacterias acidificantes que pueden aparecer durante el periodo de deterioro del alimento” (Quinta, 1982).

2.3.1.1.2.2. Composición del sustrato.

“Los hongos no son exigentes desde el punto de vista nutricional y ellos se nutren de micro y macro elementos existentes en el sustrato donde se desarrollan. Sin embargo, la composición del sustrato está muy ligada a la producción de la micotoxina. La producción de AFs en cereales y semillas de oleaginosas previamente esterilizadas en autoclave e inoculadas con cepas toxicogénicas de *Aspergillus parasiticus* se evidencian en el cuadro 8” (Hesseltine, 1976).

Cuadro 8. “Producción de aflatoxina (ppm) por *Aspergillus parasiticus* en diversos sustratos”.

Sustrato	NRRL 3000	NRRL 2999	NRRL 3145
Cacahuete	107	104,0	8,50
Soja	19	2,8	0,06
Maíz	53	47,0	5,50
Trigo	72	19,0	7,10
Arroz	107	185,0	10,60
Sorgo	72	88,0	57,60

NRRL 3000, NRRL 2999 y NRRL 3145: Son cepas de *Aspergillus parasiticus*.

Fuente: Hesseltine, 1976.

“Los resultados obtenidos nos indican que la soja es un sustrato pobre para la producción de Aflatoxina, aunque le sean dadas las mejores condiciones de producción” (Hesseltine, 1976).

2.3.1.1.2.3. Minerales.

“Los minerales, están relacionados con la composición del sustrato y a pesar de que el hierro y el zinc son los elementos más importantes para un desarrollo fúngico, tanto estos como otros pueden ser necesarios para la producción de micotoxinas. Así tenemos que, las concentraciones óptimas de ciertos minerales en el ámbito laboratorial para la producción de OTA por el *Aspergillus ochraceus* NRRL 3174 fueron de: 0,055 a 2,2 mg de zinc/L de caldo de cultivo; 0,004 a 0,04 mg de cobre/L y 1,2 – 2,4 mg de hierro/L. Cuando disminuyeron las concentraciones de zinc y cobre la producción de OTA fue casi nula. La falta de algunos de esos elementos da como resultado un pobre crecimiento fúngico y una no producción de OTA” (Hesseltine, 1976).

“En el caso de la Aflatoxina, son necesarios sustratos ricos en zinc y ciertos aminoácidos para que el *Aspergillus flavus* metabolice la Aflatoxina” (Hesseltine, 1976).

2.3.1.1.2.4. Potencial de oxi – reducción (O₂/CO₂)

“Generalmente los hongos son aerobios y necesitan oxígeno para el desarrollo de sus reacciones metabólicas. Una carencia de oxígeno condiciona el crecimiento de los hongos y la ausencia total puede llegar a producir la muerte de éstos” (Hesseltine, 1976).

“El anhídrido carbónico (CO₂) puede inhibir la formación de algunas micotoxinas, como las aflatoxinas. Una atmósfera con 20 a 40 % de CO₂ en combinación con una temperatura reducida de 17 °C o bien una humedad relativa reducida o ambos factores, previenen la formación de aflatoxina en cacahuetes” (Hesseltine, 1976).

2.3.1.1.3. Factores biológicos

2.3.1.1.3.1. Presencia de invertebrados

“La presencia de insectos actúa como agente de diseminación de la microflora y por lo tanto contribuye al crecimiento y multiplicación de los hongos. El propio metabolismo del insecto eleva el contenido de humedad del sustrato y además la rotura del pericarpio permite la infección del interior del grano” (Gimeno y Martins, 2011).

2.3.1.1.3.2. Cepas específicas.

“En una misma especie fúngica, no todas las cepas se comportan de la misma forma. Así tenemos que, la cepa NRRL 1957 de *Aspergillus flavus* no produce aflatoxina, sin embargo, ella es producida por otras cepas como: NRRL 3251, NRRL 3357, NRRL 3517 y NRRL 3353” (Hesseltine, 1982).

2.3.1.2. Aflatoxinas (AFs)

Entre las micotoxinas, las AFs se consideran las más tóxicas, con efectos económicos negativos para la agricultura (Mitchell et al., 2016; Ostry et al., 2017).

En Estados Unidos (EE. UU.) y en la Unión Europea (UE), las AFs son principalmente una preocupación económica, mientras que en los países en desarrollo de Asia y África, las AFs contribuyen a cientos de casos de carcinoma hepatocelular cada año (Mitchell et al., 2016; Liu y Wu, 2010).

Las AFs son producido por varias especies de *Aspergillus*, de las cuales *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* son las fuentes más importantes de contaminantes en los alimentos. *A. flavus* producen aflatoxinas B₁ (AFB₁) y aflatoxina B₂ (AFB₂), mientras que *A. parasiticus* producen AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂. Las denominaciones Blue (azul) y Green (verde) es por las reacciones de fluorescencias a la luz ultravioleta de las AFs. Mientras que solo el 40 % de los aislamientos de *A. flavus* producen aflatoxinas en el cultivo, esencialmente todos las cepas de *A. parasiticus* producen estas micotoxinas (Pitt et al. 2013).

Desde el descubrimiento de las aflatoxinas como agentes causales de la enfermedad de Turquía X, que mataron a 100 000 pavos jóvenes en Gran Bretaña en 1960, las AFs han sido las más estudiadas (Pitt y Miller, 2016).

Los hongos productores de AFs crecen en una variedad de alimentos tales como cereales (maíz, arroz, cebada, avena y sorgo), cacahuètes, nueces molidas, pistachos, almendras, nueces y semillas de algodón (Boevre et al., 2012). En el alimento, descomponen las proteínas, los carbohidratos y el aceite (Pozas y Abad, 2010).

“AFB₁, es altamente estable en medio ácido del tracto digestivo y son absorbidos en el intestino para luego adherirse a sus receptores en el hígado y otros tejidos. En el hígado es hidroxilado a nivel microsomal (enzimas citocromo P450), generando AFP₁, AFM₁, AFQ₁ y el 8 – 9 – epóxido” (Gonzales y Yu, 2006).

El órgano diana importante de AFB₁ es el hígado, donde la toxina se metaboliza principalmente por CYP1A2 y CYP3A4 que dan como resultado la formación de aductos de ADN y causan numerosas mutaciones en el gen supresor de tumores p53 (Kensler et al., 2011), además la AFB₁ induce un estrés oxidativo in vivo, así como in vitro (Parveen et al., 2014), independientemente de la bioactivación enzimática.

“AFB₁ es el más común y potente de las aflatoxinas, se clasifica como carcinogénico del grupo 1 y se considera un factor de riesgo para el desarrollo del carcinoma hepatocelular, según la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC, 2012). Además, la exposición a la aflatoxina sinergia con la infección crónica por el virus de la hepatitis B, lo que aumenta el riesgo de cáncer de hígado” (Liu et al. 2012).

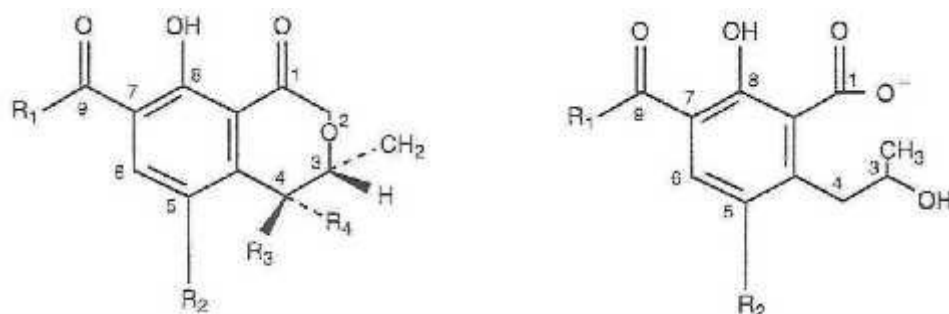
“AFM₁, puede detectarse en la leche después de 12 a 24 horas de alimentar a las vacas con alimento contaminado con AFB₁, y la concentración de AFM₁ en la leche se correlaciona con los niveles de AFB₁ en los alimentos crudos (Prandini et al., 2009). La AFM₁ y AFM₂ pueden eliminarse a través de la leche en humanos y animales. Se estima entre 0,3 y 6,2 % de AFB₁ en forma de AFM₁” (Creppy, 2002).

AFM₁ también se puede detectar en algunos productos lácteos, como el queso con una concentración más alta que la de la leche cruda, ya que AFM₁ es estable al calor, se une bien a la caseína y no se ve afectado por el proceso de elaboración del queso (Barbiroli et al., 2007). La AFM₁ figura en el grupo 2B (posible carcinogénico en humanos) por la IARC (Ostry et al., 2017).

La exposición a aflatoxinas en la dieta también puede afectar el sistema inmunitario y las funciones renales (Mulder et al. 2015).

2.3.1.3. Ocratoxina

Descubiertas en 1965 en Sudáfrica, son producidos por *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium verrucosum* y otras especies de *Penicillium*. La micotoxina más importante es la OTA (Duarte et al., 2010).



R1	R2	R3	R4	R5	Micotoxinas
Fenilalanina	C1	H	H	H	Ocratoxina A
Fenilalanina	H	H	H	H	Ocratoxina B
Fenilalanina, éter ester	C1	H	H	H	Ocratoxina C
OH	C1	H	H	H	Ocratoxina
OH	H	H	H	H	Ocratoxina B

Figura 1. Estructura molecular de las Ocratoxinas.

Fuente: Pavón et al. (2007).

Las ocratoxinas pueden contaminar productos derivados de animales (carne y leche), y también se puede encontrar en la leche humana (Stoev, 2013).

OTA está clasificada por IARC en el grupo 2B (posible carcinogénesis en humano), y esta relacionado con nefropatía endémica balcánica (BEN), enfermedad renal crónica degenerativa que afectan a los Europeos del sudeste (Ostry et al., 2017).

La exposición a bajas concentraciones de OTA en animales domésticos y experimentales conduce a alteraciones morfológicas y funcionales en los tejidos renales y hepáticos (Malir et al., 2013).

Los hepatocitos tratados *in vitro* con OTA, disminuyen significativamente la viabilidad celular y aumentan las actividades séricas de transaminasa de aspartato y transaminasa de alanina; los niveles de antioxidantes hepáticos, como la superóxido

dismutasa y el glutatión se reducen, y el malondialdehído producto de la peroxidación de lípidos aumenta; sin embargo, con tratamientos previos con citoprotectores del compuesto amonio glicirricina (CAG), L – arginina (L – Arg), silimarina (Sil) y glucurolactona (GA) mejora significativamente estas alteraciones y Sil ejerce el efecto hepatoprotector óptimo (Zugong et al., 2018).

Entre los principales mecanismos celulares de la toxicidad inducida por OTA esta la activación de la apoptosis, particularmente en la toxicidad renal (Li et al., 2011). Los hepatoprotectores: CAG, L – Arg, Sil y GA, disminuyen la tasa de apoptosis e invierten significativamente los aumentos de los niveles de expresión del ARNm de caspasa – 3, que se determina mediante la reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa cuantitativa (Zugong et al., 2018).

La OTA puede exhibir hepatotoxicidad en los pollos pero CAG, L – Arg, Sil y GA pueden proteger al hígado contra esto a través de mecanismos anti – oxidativos y anti – apoptosis. Además, es probable que CAG y GA medien sus efectos a través de la vía de apoptosis dependiente de la mitocondria; sin embargo, el mecanismo hepatoprotector exacto de L – Arg y GA requiere más investigación. Por lo tanto, CAG, L – Arg, Sil y GA son posibles candidatos para la prevención y el tratamiento de la lesión hepática del pollo (Zugong et al., 2018).

En la intoxicación aguda, los animales están deprimidos, con anorexia, ascitis, y con edemas subcutáneos y mesentéricos (Cevallos et al., 2007).

En la intoxicación crónica disminuye el apetito y el crecimiento, aumenta el consumo de agua y aparece poliuria que es consecuencia de los riñones dañados. Se tiene un efecto inmunosupresor por la atrofia de los órganos linfoides (timo y bolsa de Fabricio), depleción y regresión de linfocitos en los órganos linfoides afectando significativamente la inmunidad celular y humoral, con reducción de inmunoglobulinas en circulación sanguínea (Cevallos et al., 2007).

2.3.1.4. Tricotecenos

“Reciben este nombre por poseer en su molécula el esqueleto tetracíclico 12,13 – epoxitricotec – 9 – eno, con doble enlace entre C9 y C10, y un grupo epóxido entre C12 y C13, de gran estabilidad frente a nucleófilos. Pueden tener

grupos hidroxilos o acetilos en ciertas posiciones del núcleo y cadenas laterales de estructura variada” (Soriano, 2007).

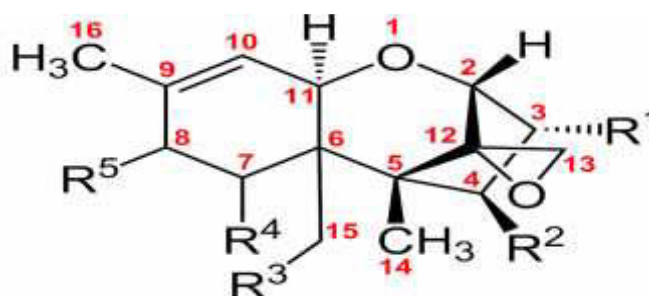


Figura 2. Estructura molecular de los Tricotecenos

Fuente: Soriano, 2007.

“Los tricotecenos son producidas por hongos del género *Fusarium*, tales como: *Fusarium tricinctum*, *F. nivale*, *F. roseum*, *F. graminearum*, *F. solani*, *F. oxysporum*, *F. lateritium*, *F. sporotrichioides*, *F. rigidiusculum*, *F. episphaeria* y *F. poae*. Otros hongos también pueden producir toxinas tricotecenos, como: *Cephalosporium crotocigenum*, *Myrotecium verrucaria*, *Stachybotrys atra*, *Calonectria nivalis*, *Trichoderma viride*, *Tricotecium roseum* y *Gibberella saubinetti*” (Gimeno y Martins, 2011). Económicamente, los más importantes son *F. graminearum* y *F. culmorum*, que causan el tizón en la cabeza por *Fusarium*, una enfermedad destructiva de los cultivos de cereales con un impacto económico mundial (Bottalico y Perrone, 2002).

Los tricotecenos son los más diversificados químicamente de todas las micotoxinas (Marin et al., 2013). Contamina principalmente cereales como el trigo, la cebada, la avena, el centeno, el maíz, y el arroz (Yazar y Omurtag, 2008). También pueden estar presentes en la soya, las papas, las semillas de girasol, el maní y los plátanos, y se han encontrado en algunos alimentos procesados derivados de cereales (pan, cereales para el desayuno, fideos, etc.) y cerveza (Bennett y Klich, 2003).

“Los más significativos como contaminantes naturales son: la toxina T – 2, el diacetoxiscirpenol (DAS), el deoxinivalenol (DON), y el nivalenol” (Dänicke et al, 2007).

Según la especie productora, estructura y grupo funcional, los tricotecenos se dividen en cuatro grupos (Dominguez, 2005), como se evidencia en el cuadro 9.

Cuadro 9. Tricotecenos, según grupo funcional

Grupos	Especies	Grupo funcional	Micotoxinas
A	<i>F. tricinactun</i>	No acetónico en el C8	Toxina T – 2
	<i>F. sporotrichioides</i>		HT – 2
	<i>F. poe</i> y <i>F. equiseti</i>		Diacetoxiscirpenol (DAS)
B	<i>F. graminearum</i>	Carbonilo en el C8	4 – deoxinivalenol (DON o
	<i>F. culmorum</i>		Vomitoxina), Nivalenol)
C	Pocas especies	Grupo epóxido en los C7 y C8 o C9 y C10	
D	<i>Stachybotrys chartarum</i>	Anillo macrocíclico	Satratoxina
	<i>Myrothecium</i>	entre C4 y C5 con dos enlaces estéricos	

Fuente: Dominguez, 2005.

El grupo A y B son contaminantes naturales de los cereales. El grupo D son generalmente producidos en el interior de los almacenes. El grupo C es el menos frecuente (Dominguez, 2005).

El principal mecanismo de la toxicidad de los tricotecenos, es la inhibición de la síntesis de proteínas ribosómicas, seguida de una interrupción secundaria de la síntesis de ADN y ARN (Richard, 2007).

En general, los signos comunes de toxicidad en animales por tricotecenos están relacionadas a lesiones bucales y hemorragia intestinal que ocasionan el rechazo de alimento, crecimiento lento, disminución en la producción de huevos en gallinas ponedoras y supresión de respuestas inmunitarias (Pestka, 2007).

La toxina T – 2 pertenecen al grupo tipo A de los Tricotecenos producidos por *Fusarium* y el hígado es el principal órgano blanco (Medina et al., 2010).

“La acción tóxica de la toxina T – 2, producen problemas agudos a nivel del tracto gastrointestinal, degeneración de la medula ósea, destrucción de los tejidos hematopoyéticos y una inhibición muy significativa del sistema inmunitario. Pueden surgir lesiones graves en la molleja de las aves. Las típicas lesiones orales en las aves consiste en una proliferación de placas blanco amarillentas caseosas en la parte inferior y superior del pico, mucosa del paladar, boca y lengua” (Leeson et al.. 1995). “También produce necrosis (epidermis y folículo de la pluma) y la inhibición de la síntesis proteica, ocasionando problema para el emplume de las aves” (Hoerr et al., 1982).

“Toxina T – 2, presenta alta toxicidad para macrófagos de pollos, inhibiendo su capacidad fagocitaria. También induce la formación de peróxidos a partir de los lípidos, acarreando la disminución de la concentración de vitamina E en las aves” (Mallmann, 2007).

2.3.1.5. Normativas y regulaciones de las micotoxinas

La FAO, 1995 y la OMS, han establecido límites máximos permitidos de micotoxinas en los alimentos, basados en los riesgos en la salud animal y peligro carcinogénico en salud humana y animal. En el cuadro 10 se reportan los niveles máximos de micotoxinas, según el tipo de animal (Gimeno, 2010).

Cuadro 10. Niveles máximos permitidos de micotoxinas en el alimento para animales

Animal	Micotoxinas en ppb		
	AFB₁	OA	T-2
Aves jóvenes:	10	50	150
Pollos, pollitas, patos y pavos			
Aves adultas:	20	100	150
Pollos, patos y pavos			
Gallinas:	20	100	150
Reproductoras y ponedoras			
Cerdos jóvenes:	20	50	150
Menor de 34 K de Peso Vivo (KPV)			
Cerdos adultos:	50	50	200
34 – 57 KPV			
Cerdos adultos:	100	50	200
> 57 KPV			
Cerdas	25	50	200
Verracos	25	50	200
Terneros, corderos y cabritos	10	ND*	ND
Bovidos, ovinos y caprinos adultos no lecheros	25	ND	100
Bovinos, ovinos y caprinos lecheros	5 – 25	ND	100
Caballos adultos no reproductores	50	ND	50
Gazapos	10	2 500	100
Conejos adultos	10	5 000	100
Conejas	10	5 000	100

*ND: no disponible

Fuente: Gimeno, 2010.

2.3.1.6. Análisis de las micotoxinas en los alimentos

Un importante problema mundial de seguridad alimentaria es la presencia de micotoxinas en los productos alimenticios (Moretti et al., 2017).

La determinación de los niveles de micotoxinas en las muestras de alimentos generalmente se realizan mediante métodos que incluyen ciertos pasos comunes: muestreo, homogeneización, extracción seguida de una limpieza, y finalmente la detección y cuantificación que se realiza por muchas técnicas instrumentales y no instrumentales (figura 3) (Shephard, 2016)

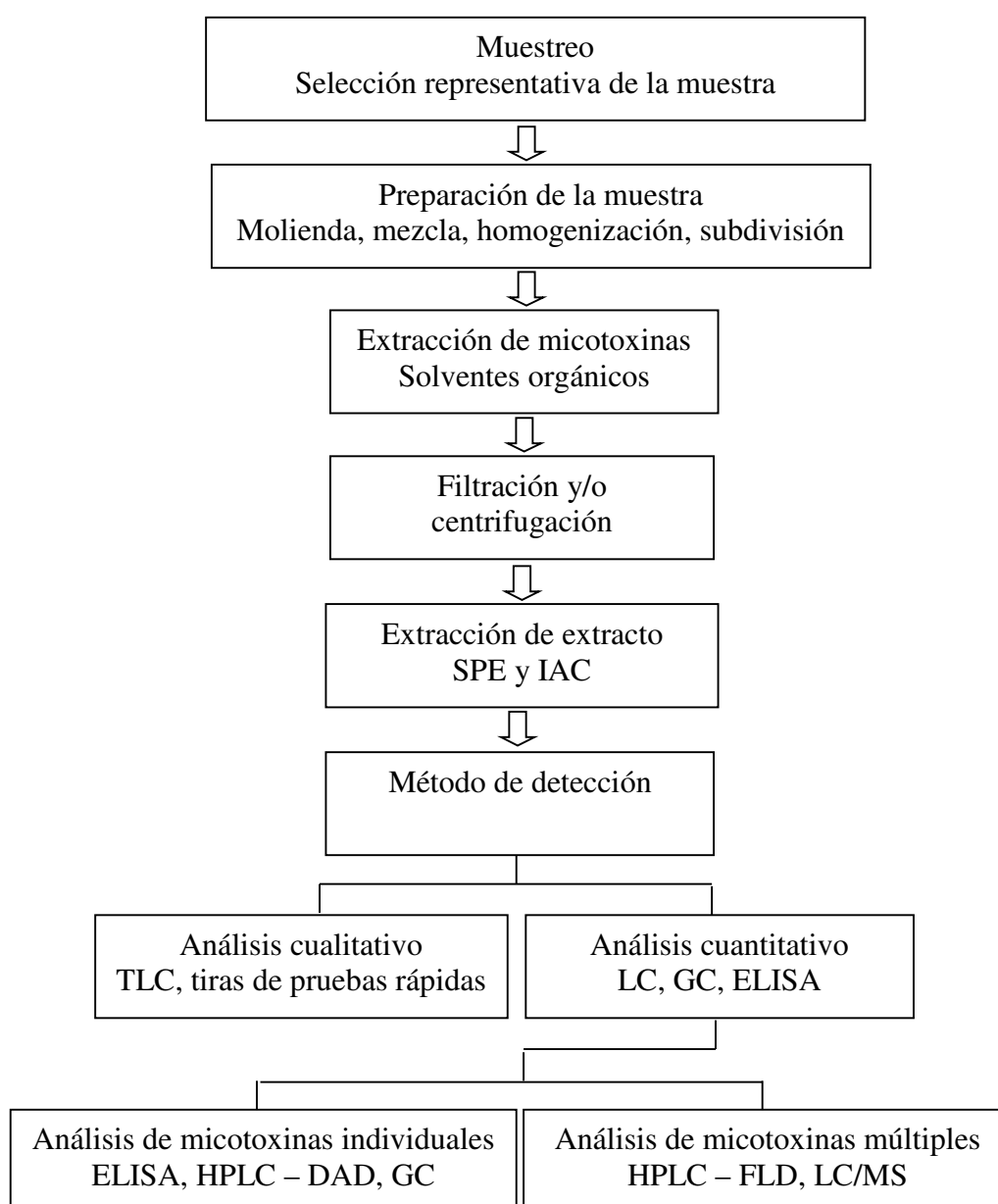


Figura 3. Análisis de las micotoxinas en los alimentos

Fuente: Shephard, 2016.

2.3.1.6.1. Técnicas de muestreos

Para el análisis de micotoxinas, es importante el muestreo, que representa el mayor porcentaje de error en el resultado (Ramos, 2015).

Cuadro 11. “Error total del análisis de micotoxinas”.

Etapas	Error (%)			
	Muestreo	Submuestreo	Pre – análisis	Análisis
Lote	3 – 50			
Muestra		2 – 30		
Preparación de muestra			1 – 2	
Análisis				0,5 – 2,0

Fuente: Ramos, 2015.

El paso clave en el análisis de las micotoxinas en los alimentos es el procedimiento de muestreo, que contribuye a la confiabilidad de los resultados y la decisión final de cumplimiento o incumplimiento para un lote completo de alimentos (Turner et al., 2015).

Debido a la distribución desigual de las micotoxinas en los alimentos, es muy difícil obtener una muestra representativa del lote (Ridgway, 2012). Por lo tanto, un plan de muestreo cuidadosamente considerado debe ser implementado para garantizar que la muestra analizada sea representativa de todo el volumen y garantizar la veracidad de los resultados de la muestra (Shephard, 2016).

“El muestreo se puede aplicar a las distintas formas de comercialización de los insumos alimenticios: granel, contenedores, envases individuales (sacos o bolsas) o envases para la venta al por menor. Debido a que la distribución de las micotoxinas en los insumos y en el alimento es muy heterogénea, sobre todo con tamaño grande de la partícula en comparación con partícula pequeña; por lo que, se debe considerar mayor tamaño de muestra para tener la misma representabilidad. En productos transformados, la distribución de micotoxinas es más homogénea que en los productos no transformados. Muestreo de alimentos líquidos tienen menor error que alimentos sólidos o particulados. Los alimentos en polvos o en pasta presentan un menor error. Los alimentos en los que se pueden encontrar micotoxinas como

producto del metabolismo de los hongos sobre el pienso contaminado, presentan una distribución de las micotoxinas mas homogénea. Es mas difícil obtener una muestra representativa de un lote estático que de un lote con una corriente en movimiento del producto (lote dinámico). La muestra deben formarse por la acumulación de muchas porciones pequeñas recogidas de diferentes puntos del lote. En lotes estáticos hay que asegurarse, dentro de lo posible, de que las muestras elementales se tomen aleatoriamente de diferentes lugares y profundidades del lote. Preferentemente se debe tomar la muestra tras un mezclado reciente. En lotes dinámicos es mas fácil obtener un muestreo alaeatorio para lo cual es muy útil el empleo de muestreadores bajo corrientes” (Ramos, 2015).

Los métodos de muestreo están descritos por la UE en virtud del Reglamento N° 401/2006 de la Comisión (Shephard, 2016), en la que se indica que es importante que las muestras sean representativas del lote para detectar el contenido real de micotoxina en el producto y se recomienda lo siguiente:

- Debe ser efectuada por una persona autorizada y calificada.
- La muestra global se obtendrá de la agrupación de “muestras elementales de distintos puntos del lote o sublote”.
- Emplear envases limpios y secos, de plástico o aluminio para evitar la contaminación durante el transporte.
- Tomar precauciones “para evitar cualquier modificación de la composición de la muestra durante el transporte o el almacenamiento”.
- Rotular e identificar las muestras inmediatamente después de la toma, indicando (producto, destino del producto, identificación del lote, peso del lote, el lugar y la fecha del muestreo).
- La cantidad estimada a muestrear según el tamaño del lote, se resume en el cuadro 12 (Shephard, 2016).

Cuadro 12. Cantidad mínima de muestra, según el tamaño del lote

Tipo de muestra	Tamaño de lote en toneladas	Cantidad mínima (K)
Cereales y frutos deshidratados (excepto higos secos)	≥ 50	10
	50 – 10	6
	10 – 03	2
	< 03	1
Frutos secos (maní, nueces), higos desechados	≥ 05	3
	02 – 05	2
	< 02	1
Frutas deshidratadas (excepto higos secos)	≥ 10	10
	10 – 02	6
	< 02	1,5
Derivados de frutos secos (pasta de maní)	≥ 05	3
	02 – 05	2
	< 02	1
Especias	≥ 10	10
	10 – 02	6
	< 02	1,5
Alimentos lácteos, alimentos preparados para lactantes		1 L o 1 K
Café y productos de café	≥ 10	10
	10 – 02	6
	< 02	1,5
Zumos de fruta, mostos, sidrae y vinos		1 L o 1 K
Productos sólido a base de manzana, incluidos los destinados a lactantes y niños de corta edad		1

Fuente: Diario Oficial de la Unión Europea (2006)

Submuestreo para la detección de micotoxinas

De la muestra global, hay que obtener la submuestra. “Si las submuestras se van a obtener usando un separador mecánico aleatorio, no es necesario mezclar bien la

muestra; en caso contrario hay que mezclar bien la muestra y separar posteriormente las submuestras” (Ramos, 2015).

2.3.1.6.2. Preparación de la muestra: Extracción y limpieza de micotoxinas

La selección de los métodos para la extracción y limpieza de micotoxinas a partir de muestras de alimentos generalmente se rigen por tres factores principales: las propiedades químicas de las micotoxinas, la naturaleza de la matriz alimentaria y el método de detección que se utilizará (Ridgway, 2012).

La mayoría de las muestras de alimentos líquidos, como la leche, el vino y el jugo de manzana, se someten a extracción líquido – líquido para separar inicialmente las micotoxinas. Sin embargo, también se puede utilizar extracción sólido – líquido, especialmente para la extracción de micotoxinas de granos, alimentos de cereales y otros materiales sólidos (Pereira et al., 2014).

La mayoría de las micotoxinas son altamente solubles en disolventes orgánicos tales como metanol, acetonitrilo, acetona, cloroformo, diclorometano o acetato de etilo, pero difícilmente soluble en agua (Ridgway, 2012). Sin embargo, las fumonisinas son solubles en agua ya que contienen cuatro grupos carboxilo libres y uno grupo amino, y AFB₁ es altamente estable en una mezcla de agua y acetonitrilo (Bennett y Klich, 2003).

Una mezcla de los disolventes orgánicos con la adición de cierta cantidad de agua o un tampón ácido se utilizan con frecuencia para extraer micotoxinas (Rahmani et al., 2009). Mientras que la adición de agua mejoraría la penetración de los disolventes orgánicos en la matriz alimentaria, un disolvente ácido puede romper los enlaces fuertes entre los analitos y otros componentes de los alimentos, como proteínas y azúcares, lo que lleva a una mejor extracción eficiente de la micotoxina (Rahmani et al., 2009).

Para muestras con alto contenido de lípidos, solventes no polares tales como hexano y ciclohexano se utilizan (Turner, 2009).

Recientemente, se han utilizado muchos métodos de extracción de solventes automatizados instrumentales en el análisis de micotoxinas, incluida la extracción con fluidos supercríticos (SFE), la extracción con disolventes acelerada (ASE) y extracción asistida por microondas (MAE) (Pereira et al., 2014). En comparación con los métodos convencionales, estos métodos aceleran la extracción de micotoxinas, requieren volúmenes más pequeños de solvente químico (que es por lo tanto, más respetuosos con el medio ambiente), y generalmente proporcionan mejores eficiencias de extracción; sin embargo, tales métodos automatizados pueden ser costosos (Kralj y Prosen, 2009).

Después de la extracción de micotoxinas; la filtración y centrifugación, son pasos importantes para eliminar cualquier partícula interferente antes de realizar la limpieza del extracto, que es un proceso importante para eliminar aquellas sustancias que pueden interferir con la posterior detección de micotoxinas. Al limpiar el extracto, la especificidad y sensibilidad se mejora, lo que mejora la precisión (Turner, 2009).

Una variedad de métodos de limpieza se han implementado incluyendo partición líquido – líquido, extracción en fase sólida (SPE), columna de inmuta afinidad (IAC), cromatografía de columna, columnas de intercambio iónico y columnas de limpieza multifuncionales (Pereira et al., 2014).

Los métodos más utilizados para la limpieza de micotoxinas son SPE y IAC, ya que son rápidos, eficientes, reproducibles y seguros, con un amplio rango de selectividad (Hu et al., 2016).

SPE es una técnica basada en la partición específica del analito disuelto en el extracto (fase móvil) y la fase estacionaria (cartucho), que se compone de un adsorbente sólido donde las micotoxinas se absorben y luego se eluyen con un disolvente orgánico (Rahmani et al., 2009).

IAC están llenos de fase sólida activada unida a un anticuerpo específico para una micotoxina (s) determinada (s). Cuando el extracto pasa a través de la columna, la micotoxina se une selectivamente a los anticuerpos, mientras que otro componente

de la matriz se eliminará mediante un paso de lavado. La micotoxina se eluye luego con un disolvente miscible como metanol (Pereira et al., 2014).

2.3.1.6.3. Métodos analíticos

2.3.1.6.3.1. Métodos inmunoquímicos

Entre todos los métodos inmunológicos publicados, el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) probablemente se usa más comúnmente para la determinación de micotoxinas (Pereira et al., 2014).

ELISA, con muchos kits disponibles comercialmente para la detección y cuantificación de las principales micotoxinas que incluyen AFB₁, AFM₁, OTA, ZEN, DON, fumonisinas y toxina T – 2 (Pereira et al., 2014).

Los métodos ELISA han sido validado en una amplia variedad de matrices de alimentos (Pereira et al., 2014).

Mientras que ELISA se puede realizar de varias maneras como el ensayo directo, el ensayo competitivo directo y el ensayo competitivo indirecto; el ensayo competitivo directo es el más utilizado (Kos et al., 2016).

2.3.1.6.3.1.1. ELISA competitivo directo

“El principio de este tipo de ELISA se basa en la competencia de la micotoxina presente en la muestra y en el conjugado (micotoxina marcados con enzima, generalmente la peroxidasa, también la fosfatasa alcalina y – galactosidasa) por los mismos sitios de enlace presentes en el anticuerpo inmovilizado en la superficie sólida (Turner, 2009). Debido a que la concentración de conjugado y anticuerpo son constantes, la intensidad del color es inversamente proporcional a la concentración de micotoxina” (Yao et al., 2015).

Procedimiento:

- El anticuerpo contra micotoxina se inmoviliza en un soporte insoluble (esfera o tubo de poliestireno, esfera de nylon o tarjeta de material plástico, o bien placa para microtitulación).
- Lavado para eliminar los anticuerpos fijados deficientemente o no fijados.

- Adición del conjugado y la muestra en estudio (para detectar micotoxina).
- Paralelamente, se añade únicamente conjugado.
- Se lava para eliminar los antígenos que no hayan reaccionado con el anticuerpo.
- Se agrega un sustrato “peróxido de hidrogeno que actúa como un oxidante cromógeno”. La enzima del conjugado al actuar sobre el sustrato determina la reacción entre el anticuerpo y la micotoxina del conjugado.
- Luego se añade la solución de “stop”.
- “Lectura visual o colorimétrica (espectrofotómetro) del producto final coloreado de ambas pruebas y se comparan los resultados. Si las lecturas de ambas pruebas son análogas, el antígeno de la muestra en estudio no tienen nada que ver con los anticuerpos empleados para tapizar el soporte. Si hay diferencia en las lecturas de ambos pocillos, el antígeno de la muestra en estudio, está relacionado serológicamente con el anticuerpo empleado para tapizar el soporte y la diferencia de densidad óptica, es proporcional a la concentración del antígeno problema en la muestra” (Zeng et al., 2006)

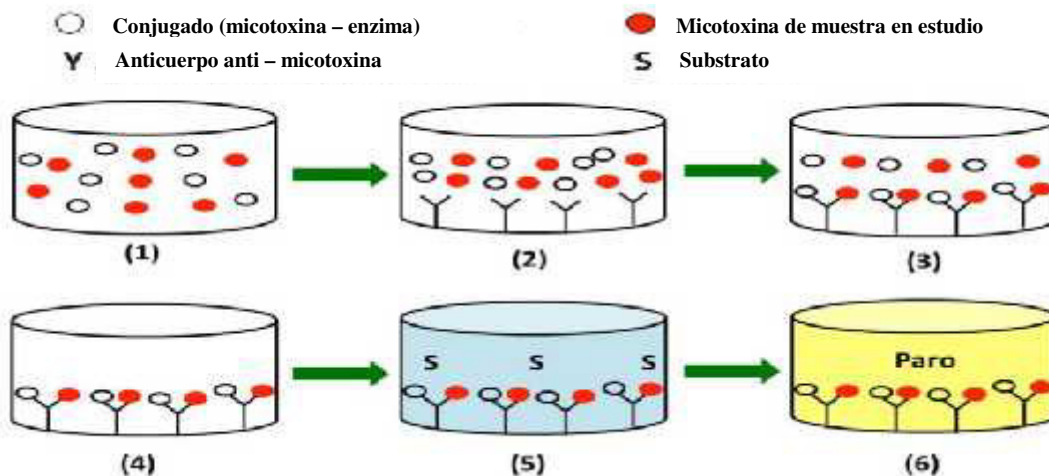


Figura 4. ELISA competitivo directo para micotoxinas

Fuente: Zeng et al., 2006.

2.3.1.6.3.1.2. ELISA competitivo indirecto

“Emplea un anticuerpo primario y un conjugado (anti – anticuerpo unido a una enzima). Las micotoxinas de la muestra y de la fase sólida compiten por los mismos sitios de unión del anticuerpo primario en solución. Es un método mas económico y mas sensible. Su desventaja es el tiempo para la obtención de resultados, de 2 a 3

horas, y requieren mayor manejo y especialización por lo que sólo se realizan en laboratorios de investigación” (Turner, 2009).

Procedimiento:

- La micotoxina es inmovilizada a través de “una proteína o un polipéptido en una placa de microtitulación”.
- Se incuba con el anticuerpo primario y la muestra en estudio (para detectar la presencia o ausencia de la micotoxina homóloga).
- Lavado para eliminar lo que no se unió a la micotoxina inmovilizada.
- Adición del conjugado.
- “Se adiciona el sustrato para determinar la cantidad de anticuerpo enlazado a la micotoxina inmovilizado en la placa” (Turner, 2009).

“Generalmente, ELISA es aproximadamente de 10 a 100 veces más sensible que los radioinmunoensayos para detectar micotoxinas purificadas. Logrando detectar valores tan bajos como 2,5 picogramo (pg), que equivale a $2,5 \times 10^{-12}$ g de micotoxinas puras. ELISA permite que las determinaciones de aflatoxinas, toxina T – 2 o de deoxinivalenol, se realicen en menos de una hora, después del proceso de extracción. La sensibilidad del ELISA se mejora cuando se realizan procesos de purificación de extractos y es específica para cada micotoxina (Cuadro 13)” (Zheng, 2006).

Cuadro13. “Sensibilidad de ELISA para ensayos de micotoxinas”.

Micotoxinas	Aplicación	Límites de detección (ppb)
AFB/AF	Maiz, trigo, mani	1 – 10
Aflatoxina M	Leche	0,01
Deoxinivalenol	Maiz, trigo	300
Ocratoxina A	Maiz, trigo	5
Toxina T – 2	Maiz, trigo	2,5 – 50
Zearalenona	Maiz	100

Fuente: Zheng, 2006.

ELISA proporciona una rápida, específica y relativamente es un método fácil de usar para el análisis de micotoxinas en alimentos. Sin embargo, tiene ciertas desventajas, incluyendo reactividad cruzada potencial y dependencia de una matriz específica. Además, el kit detecta solo una micotoxina y está diseñada para un solo uso; Por lo tanto, puede ser costoso si uno necesita analizar múltiples micotoxinas (Yao et al., 2015).

Los resultados positivos de ELISA deben ser confirmados por un adecuado método cromatográfico, especialmente cuando se utiliza en una matriz no especificada por el fabricante (Shephard, 2016).

2.3.1.6.3.2. Técnicas cromatográficas

La cromatografía es el método más utilizado para el análisis de micotoxinas en alimentos (Shephard, 2016).

El primer método cromatográfico, es la “cromatografía en capa fina (TLC)”, que se utiliza como un método de detección rápida para ciertas micotoxinas por evaluación visual o densitometría instrumental (Shephard, 2008). Sin embargo, las tendencias actuales en el análisis de micotoxinas en alimentos se centran en la aplicación de tecnologías robustas, rápidas, fáciles de usar y baratas que pueden detectar y cuantificar diversas micotoxinas con una alta sensibilidad y selectividad en una sola corrida (Rahmani et al., 2009). Para satisfacer esas necesidades, muchos métodos cromatográficos, tales como HPLC junto con ultravioleta (UV), detectores de matriz de diodos (DAD), fluorescencia (FLD) o espectrometría de masas (MS) (Pereira et al., 2014). Adicionalmente, cromatografía de gases (GC) acoplados con detectores de captura de electrones (ECD), ionización de llama (FID) o MS se han utilizado para identificar y cuantificar micotoxinas volátiles como tricotecenos y patulina (Pereira et al., 2014). Debido a la baja volatilidad y alta polaridad de la mayoría de las micotoxinas, el análisis de GC a menudo requiere un paso de derivación; por lo tanto, este método se usa raramente en el “análisis de micotoxinas” (Orata, 2012).

El “análisis de micotoxinas” ha sido muy avanzado mediante el acoplamiento de técnicas de cromatografía líquida a espectrometría de masas (por ejemplo, LC – MS; LC – MS/MS) (Shephard, 2016).

Mientras que la HPLC combinada con espectrometría de masas o detectores de fluorescencia se usan rutinariamente para el análisis de micotoxinas en los alimentos, otras técnicas cromatográficas rara vez se utilizan debido a la sensibilidad y especificidad limitada (Laura et al., 2016).

Los métodos de HPLC – FLD han sido adaptados por la Asociación de Químicos Analíticos Oficiales (AOAC) Internacional y por el Comité Europeo de Normalización (CEN) para la cuantificación de micotoxinas en cereales (Pascale, 2009). Mediante esta técnica, es posible obtener una sensibilidad comparable a la alcanzada por LC – MS/MS; sin embargo, los métodos de HPLC – FLD son generalmente más adecuados para micotoxinas individuales o grupos de micotoxinas relacionadas químicamente (Rahmani, 2013).

Se ha empleado el método de HPLC – FLD para la detección simultánea de múltiples micotoxinas: (1) AF y OTA en productos de cereal de maíz, maní mantequilla, ginseng y jengibre (Trucksess et al., 2008); (2) AF, OTA y ZEA en cereales, centeno y arroz (Rahmani et al., 2010); (3) AFs, OTA, ZEA y DON en maíz (Ofitserona, 2009).

2.3.2. Frijol soya

La soya es una especie de leguminosa que se originó en el este de Asia y uno de los cultivos más importantes en el mundo (USDA, 2016). Es originaria de China; es cultivada por sus semillas, de contenido medio en aceite y alto de proteínas. El cultivo de la soya se adapta fácilmente a diversos climas y terrenos, está ampliamente difundido a lo largo del planeta. Se considera que la semilla limpia y seca con 12 % de humedad puede ser almacenada hasta por 2 años sin pérdida de su calidad (Garzon, 2010).

En 2016/17, Brasil produjo un estimado de 114 millones, de los 351 millones de toneladas métricas de soya del mundo (32,5 %), convirtiéndolos en uno de los cultivos agrícolas más valiosos del país. Brasil es el primer exportador de soya y segundo productor de este importante cultivo, solo por detrás de los Estados Unidos (USDA, 2016).

La soya es uno de los granos más importantes del mundo. Contiene alrededor de 20 % de grasa, 40 % de proteínas, y 30 % de carbohidratos. Se utiliza principalmente como fuente de aceite comestible y proteína forrajera (Zen et al., 2018).

2.3.2.1. Características nutricionales

“El Cuadro 14 presenta el contenido promedio de los principales nutrientes del grano de soya térmicamente tratado, en comparación con la torta de soya”.

Cuadro 14. “Contenido de los principales nutrientes del grano entero y la torta de soya”.

Nutrientes	Grano de soya	Torta de soya
Energía Metabolizable, Pollo, Kcal/kg	3 300	2 440
Aceite, %	18 – 20	0,5 – 1,5
Proteína cruda, %	38,0	47,5
Lisina, %	2,40	3,02
Metionina + Cistina, %	1,08	1,41
Treonina, %	1,69	1,85
Triptófano, %	0,52	0,65
Calcio, %	0,25	0,34
Fósforo, %	0,59	0,69

Fuente: Requerimientos nutricionales de las aves (NRC), 1994.

2.3.2.2. Importancia de la soya en la alimentación animal

“La torta de soya (obtenida de la soya integral, al cual se le ha extraído el aceite con hexano), es el suplemento proteico más ampliamente utilizado en la alimentación animal. A la torta de soya se ha sumado el grano entero de soya (soya integral), que con adecuado tratamiento térmico, es utilizado en la alimentación, en especial de animales monogástricos. Combina en un solo producto, la deseada característica de tener elevadas concentraciones de energía y proteínas de alto valor biológico. Es apta para reemplazar una buena parte de la proteína animal en las raciones de aves. La harina de soya es rica en lisina y es algo pobre en metionina y cistina, por ello las

raciones formuladas principalmente a base de maíz y harina de soya tiene que suplementarse a menudo con metionina” (Garzon, 2010).

2.3.2.3. Contaminación de la soya por micotoxinas

“Varios géneros y especies de hongos capaces de producir micotoxinas han sido reportados en fríjol soya almacenado. Sin embargo, solamente tres micotoxinas han sido reportadas en soya contaminada de manera natural: AFs, OTA y toxina T – 2” (Gonzalo y Diaz, 1995).

“Los niveles de aflatoxinas detectados en soya han sido en general demasiado bajos como para constituir una amenaza para la salud y/o producción animal. Sin embargo, los niveles reportados de OTA y toxina T – 2 son potencialmente tóxicos” (Gonzalo y Diaz, 1995).

“Se considera que la soya es un sustrato pobre para la producción de AFs y el factor más importante en la protección contra la colonización fúngica y producción de AFs en soya, es la integridad de la semilla. Semillas dañadas (partidas o con quiebres en la cáscara), acumularon $60,4 \pm 20,3$ ppm de AFs luego de la inoculación con esporas de *Aspergillus flavus* (*A. flavus*), mientras que las semillas intactas acumularon solamente $0,5 \pm 0,2$ ppm” (Stössel, 1986). “La cáscara del fríjol, no solamente impide la colonización del cotiledón por parte del hongo, sino que también asegura un bajo nivel de humedad al interior de la semilla. Otro factor es la humedad del grano, una humedad relativa del 70 % y una temperatura ambiental de 20 °C; el nivel seguro de humedad del grano almacenado debe ser del 12 %, cuando la temperatura ambiental es de 30 °C; el nivel máximo de humedad debe ser del 11,5 %, y si sobrepasa, se facilita la colonización y el crecimiento de hongos saprofitos y por ende la producción de micotoxinas” (Williams, 1991).

“Los inhibidores de tripsina presentes en la soya no afectan el crecimiento de especies aflatoxigénicas de *A. flavus* ni la producción de aflatoxinas, tampoco la disponibilidad de zinc o la presencia de fitatos” (Stössel, 1986). Sin embargo, la soya integral en comparación con la torta de soya, luego de inocular *A. parasiticus*; presentaron niveles de AFB₁ de 3 y 4 ppm, y de AFG₁ de 62 y 202 ppm, respectivamente (Ehrlich y Ciegler, 1985).

“La soya esterilizada constituye un sustrato mas favorable para la producción de AFs que la no esterilizada, según el cuadro 15”.

Cuadro 15. “Produccion de aflatoxinas por *A. parasiticus* inoculado en soya no esterilizados y esterilizados”.

Soya	Concentración de aflatoxinas (ppm)				
	B ₁	B ₂	G ₁	G ₂	Total
No esterilizados	117	8	323	25	473
Esterilizados	292	40	364	63	759

Fuente: Farag et al., 1986.

“El proceso de esterilización podría facilitar la producción de aflatoxinas debido: (1) rompimiento de la cutícula externa del grano, (2) destrucción de microorganismos que compiten con el hongo toxigénico, ó (3) destrucción de algún tipo de compuesto termosensible que impide la síntesis de las micotoxinas” (Farag et al., 1986).

“En estudios *in vitro*, se ha demostrado que cuando las semillas viables de soya son infectadas por *A. flavus*, producen la fitoalexina (gliceolina), que disminuye sustancialmente la producción de AFB₁, sin afectar el crecimiento del hongo; lo que explicaría de manera parcial, el porqué, la contaminación con AFs en soya es tan esporádica” (Song y Karr, 1993).

“Otro factor, que podría contribuir a la resistencia de la soya a la contaminación con AFs, es por las mismas lipasas secretadas por el hongo en crecimiento que generan aldehídos volátiles por la vía de la lipoxigenasa y particularmente el hexanal, tiene acción antifúngica (Doehlert, 1993); así mismo los ácidos grasos linoléico y linolénico que representan el 55 % del total de ácidos grasos presentes en la soya, inhiben la germinación de esporas de *A. flavus* (Farag et al., 1986). Los ácidos palmítico, esteárico y oléico no causaron ningún efecto sobre la germinación de esporas” (Doehlert et al., 1993).

“Según estudios realizados en Inglaterra, las OTs parecen ser las micotoxinas más importantes de la soya y sus subproductos. Incidencias del 19 a 36 % y niveles de 50

a 500 ppb de OTA han sido reportados en soya y subproductos de soya. Niveles de 500 ppb son potencialmente tóxicos para la mayoría de especies susceptibles, tales como humanos, aves, cerdos, perros” (Leeson et al., 1995).

“De los tricotecenos, solamente se ha reportado la presencia de la toxina T – 2 en soya. Esta micotoxina es una de las más tóxicas y son conocidos sus efectos toxicológicos en animales” (Díaz et al., 1994).

CAPÍTULO 3: METODOLOGÍA

3.1. “Tipo y diseño de investigación”

“Descriptivo, prospectivo, de corte transversal, observacional y no experimental; empleándose 20 muestras para determinar los valores de micotoxinas por el método de ELISA en soya para aves en producción en la Provincia de Chincha”.

3.2. “Unidad de análisis”

“Extracto de soya”.

3.3. “Población de estudio”

“Estudio preliminar en soya de 20 molinos de 5 distritos (Alto Laran, Grocio Prado, Sunampe, Chincha Alta y Pueblo Nuevo) de la provincia de Chincha del departamento de Ica”.

3.4. “Tamaño de la muestra”

“Para el estudio se tomaron 20 muestras, una por cada molino, como se observa en el cuadro 16”.

Cuadro 16. “Número de muestra, según los molinos de los distritos de la provincia de Chincha”.

Distritos	Nº de molinos	Nº de muestra	Porcentaje
Alto Laran	6	6	30
Grocio Prado	5	5	25
Sunampe	4	4	20
Chincha Alta	2	2	10
Pueblo Nuevo	3	3	15
Total	20	20	100

3.5. Determinación de los niveles de micotoxinas en las muestras de soya

Para la determinación de los niveles de micotoxinas en las muestras de soya se realizó mediante métodos que incluyen: muestreo, homogeneización, extracción, detección y cuantificación (figura 3) (Shephard, 2016).

3.5.1. Selección de las muestras de soya

- Por cada molino se tomó una muestra de 1,5 K de soya.
- Se seleccionaron tres sacos con soya de tres lugares aleatoriamente (dos de los extremos y uno del centro).
- De cada saco, con diferentes bolsas, se recolectaron, 5 sub muestras (4 de los extremos y 1 del centro), a través de un calador de bolsa, obteniéndose 300 g por submuestra.

3.5.2. Preparación y extracción de las micotoxinas de las muestras de soya, según las recomendaciones del fabricante (Neogen Corporation)

3.5.2.1. Preparación de las muestras de soya

La muestra de soya se trituro hasta partículas finas como el café instantáneo fino (como patrón de referencia), mediante un molino eléctrico.

3.5.2.2. Extracción de micotoxinas de las muestras de soya

3.5.2.2.1. Extracción de AFB₁, según las recomendaciones del fabricante (Neogen Corporation, 2008)

- “Se mezcló, 25 g de la muestra triturada con 125 mL de metanol 70 % y se agitó vigorosamente durante 3 min, se mantuvo en reposo durante 3 min”.
- “Del sobrenadante, 5 mL se filtró a través de una jeringa de 10 mL descartable con filtro de algodón”.
- “El filtrado (extracto de soya) se recepcionó en viales y se conservó en refrigeración a 4 °C para ser analizado”.

3.5.2.2.2. Extracción de OTA, según las recomendaciones del fabricante (Neogen Corporation, 2012)

- “25 g de la muestra se mezcló con 100 mL de metanol 50 % y se agitó vigorosamente durante 3 min, se mantuvo en reposo durante 3 min”.
- “Del sobrenadante, 5 mL se filtró a través de una jeringa de 10 mL descartable con filtro de algodón”.
- “El extracto de soya se recepcionó en viales”.

- “1 ml del extracto de soya se diluyó con 1 mL de metanol 50 % y se conservó en refrigeración a 4 °C para ser analizado”.

3.5.2.2.3. Extracción de toxina T – 2, según las recomendaciones del fabricante (Neogen Corporation, 2014)

- “Se mezcló, 25 g de la muestra con 125 mL de metanol 70% y se agitó vigorosamente durante 3 min, se mantuvo en reposo durante 3 min”.
- “Del sobrenadante, 5 mL se filtró a través de una jeringa de 10 mL descartable con filtro de algodón”.
- “1 mL del extracto de soya se diluyó con 1 mL de agua destilada y se conservó en refrigeración a 4 °C para ser analizado”. Ver (anexo 1).

3.5.3. Detección y cuantificación de micotoxinas mediante ELISA competitivo directo, según las recomendaciones del fabricante (Neogen Corporation)

- “Temperar los reactivos de 18 a 30 °C antes de ser utilizado”.
- “Ubicar en los soportes de micropocillos, 5 micropocillos de mezclado con la marca roja para los controles de micotoxinas y 1 micropocillo para cada muestra (M1 a M20)”.

3.5.3.1. Detección cualitativa de micotoxinas

3.5.3.1.1. Detección de AFB₁ (Neogen Corporation, 2008)

- “Homogenizar los reactivos suavemente con movimientos circulares sobre la mesa de trabajo”.
- “Colocar 100 µL de conjugado en cada micropocillo de mezclado (para los controles y muestras)”.
- Adicionar 100 µL de cada uno de los controles (0, 1, 2, 4 y 8 ppb de AFB₁) y 100 µL de cada uno de las muestras de (M1 a M20).
- “Mezclar los pocillos succionando y expulsando su contenido, con una micropipeta multicanal de 12, durante tres veces”.
- “Transferir 100 µL a los micropocillos recubiertos con anticuerpos”.
- “Mezclar deslizando el soporte de micropocillos para adelante y para atrás sobre una superficie plana durante 10 a 20 seg sin salpicar los reactivos”.
- “Incubar durante 10 min a temperatura ambiente de 18 a 30 °C”.
- Invertir el soporte de micropocillos y eliminar su contenido.

- “Lavar los pocillos, llenandolos con agua destilada y luego vaciarlos (repetir por cinco veces). Invertir los micropocillos y golpearlo suavemente sobre papel toalla hasta retirar el líquido remanente”.
- “Verter 100 μ L de sustrato en los micropocillos”.
- “Mezclar deslizando el soporte de micropocillos para adelante y para atrás sobre una superficie plana durante 10 a 20 seg”.
- “Incubar durante 10 min a temperatura ambiente”.
- “Adicionar 100 μ L de la solución de red stop en cada pocillo”.
- “Mezclar deslizando el soporte de micropocillos para adelante y para atrás sobre una superficie plana durante 10 a 20 seg” Ver anexo 2.

3.5.3.1.2. Detección de OTA (Neogen Corporation, 2012)

- Colocar 200 μ L de conjugado en cada micropocillo de mezclado (para los controles y muestras).
- Adicionar 100 μ L de cada uno de los controles (0, 2, 5, 10 y 25 ppb de OA) y de 100 μ L de cada uno de las muestras de (M1 a M20).
- “Mezclar los pocillos succionando y expulsando su contenido, con una micropipeta multicanal de 12, durante tres veces”.
- “Transferir 100 μ L a los micropocillos recubiertos con anticuerpos”.
- “Mezclar deslizando el soporte de micropocillos para adelante y para atrás sobre una superficie plana durante 10 a 20 seg”.
- “Incubar durante cinco minutos a temperatura ambiente de 18 a 30 °C”.
- “Invertir el soporte de micropocillos y eliminar su contenido”.
- “Lavar los pocillos, llenandolos con agua destilada y luego vaciarlos (repetir por cinco veces). Invertir los micropocillos y golpearlo suavemente sobre papel toalla hasta retirar el líquido remanente”.
- “Verter 100 μ L de sustrato en los micropocillos”.
- “Mezclar deslizando el soporte de micropocillos para adelante y para atrás sobre una superficie plana durante 10 a 20 seg”.
- “Incubar durante 10 min a temperatura ambiente”.
- “Adicionar 100 μ L de la solución red stop en cada pocillo”.
- “Mezclar deslizando el soporte de micropocillos para adelante y para atrás sobre una superficie plana durante 10 a 20 seg”. Ver anexo 3.

3.5.3.1.3. Detección de toxina T – 2 (Neogen Corporation, 2014)

- “Colocar 100 µL de conjugado en cada pocillo de mezclado (para los controles y muestras)”.
- Adicionar 100 µL de cada uno de los controles (0, 25, 50, 100 y 250 ppb de toxina T – 2) y de 100 µL de cada uno de las muestras de (M1 a M20).
- “Mezclar los micropocillos succionando y expulsando su contenido, con una micropipeta multicanal de 12 durante tres veces”.
- “Transferir 100 µL a los micropocillos recubiertos con anticuerpos”.
- “Mezclar deslizando el soporte de micropocillos para adelante y para atrás sobre una superficie plana durante 10 a 20 seg”.
- “Incubar durante cinco min a temperatura ambiente de 18 a 30 °C”.
- Invertir el soporte de micropocillos y eliminar su contenido.
- “Lavar los micropocillos, llenandolos con agua destilada y luego vaciarlos (repetir por cinco veces). Invertir los micropocillos y golpearlo suavemente sobre papel toalla hasta retirar el líquido remanente”.
- “Verter 100 µL de sustrato en los micropocillos”.
- “Mezclar deslizando el soporte de micropocillos para adelante y para atrás sobre una superficie plana durante 10 a 20 seg”.
- “Incubar durante cinco min a temperatura ambiente”.
- “Adicionar 100 µL de la solución red stop en cada micropocillo”.
- “Mezclar deslizando el soporte de micropocillos para adelante y para atrás sobre una superficie plana durante 10 a 20 seg”. Ver anexo 4.

3.5.3.2. Detección cuantitativa de micotoxinas mediante kit ELISA

- “Limpiar la base de los micropocillos con papel toalla”.
- “Eliminar las burbujas de aire (para no afectar el resultado de la lectura)”.
- “Leer la densidad óptica de cada micropocillos, antes de los 20 minutos después de la adición de la solución red stop en el lector Biotek ELX800GIDX con filtro de 650 nm”. Ver anexo 5.

3.6. Técnica de recolección de datos

“Los valores de micotoxinas se obtuvo con el lector de ELISA, con filtro de 650 nm. Se determinó la densidad óptica de las muestras, se procesaron en el programa Neogen y se obtuvo los niveles de absorbancia transfiriéndose a ppb (g/K)”.

3.7. Estándares de los niveles máximos permitidos en soya

En el siguiente cuadro 17, se indican los NMP para la soya.

Cuadro 17. “Niveles máximos permitidos de micotoxinas para la soya”

Micotoxinas	NMP (ppb)
AFB1	10
Ocratoxina A	50
Toxina T – 2	150

Fuente: Tomado de Gimeno (2010)

CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Análisis, interpretación y discusión de los resultados

“El 100 % (20/20) de las muestras de soya de los Distritos de Chíncha, considerados para el presente estudio (Chíncha Alta, Pueblo Nuevo, Grocio Prado, Sunampe y Alto Larán), resultaron positivos a AFB₁, con promedios y rangos de (\bar{x} = 1,825 ppb; 1,0 – 3,4 ppb)”; sin embargo, ninguno sobrepasó el NMP (10 ppb). Los resultados de las muestras del presente estudio, superan a lo reportado en Venezuela: 62,50 % (5/8), considerando el NMP de 20 ppb, tampoco sobrepasaron: \bar{x} = 2 ppb, 0 – 4,6 ppb (Fernandez Surumay et al., 2000); así mismo se superan los resultados obtenidos en Egipto: 35,00 % (35/100) con rango de 5 – 35 ppb; “Argentina: 9,57 % (9/94) de trazas – 36 ppb” (Fernandez Pinto et al., 1991); y Estados Unidos: 0,23 %, de 7 – 10 ppb (Shotwell et al., 1969).

“Los bajos niveles de AFB₁ en soya, en las diferentes partes del mundo, se sustentaría en que las semillas de soya producen gliceolina cuando son infectadas por *A. flavus*, disminuyendo sustancialmente la producción de AFB₁” (Song y Karr, 1993). Así mismo, “las lipasas secretadas por el hongo en crecimiento generan particularmente hexanal de acción antifúngica. De igual forma, los ácidos grasos linoléico y linolénico, presentes en la soya, inhiben la germinación de esporas de *A. flavus*” (Doehlert et al., 1993).

Los bajos niveles de AFB₁, no podrían causar efectos agudos; sin embargo, sí efectos crónicos como se demuestra que la DL50 de AFB₁ para rata es de 1 000 – 18 000 ppb, pero mediante la alimentación continua de 15 ppb de AFB₁ de 52 a 80 semanas, indujo cáncer hepático en un número significativo de ratas macho Fischer (Halver, 1969). “En humanos, la exposición a las aflatoxinas en la dieta, se considera como un factor de riesgo para el desarrollo de carcinoma hepatocelular primario, particularmente en individuos expuestos al virus de la hepatitis B” (Bennett y Klich, 2003), “con un riesgo relativo de 60 en comparación de exposición sólo a aflatoxina de 2 y exposición sólo al virus de hepatitis B, alrededor de 5” (Ross et al., 1992); “por lo que se recomienda la vacunación contra el virus de la hepatitis B para reducir la incidencia de cáncer hepático” (Henry et al., 2002).

En la producción avícola; pollos alimentados con 70 ppb de AFB₁, durante 42 días, no afectan los parámetros productivos y las lesiones hepáticas solo se aprecian por histopatología y análisis enzimático (Arrieta et al., 2006). Lo mismo ocurre en reproductores de pollos de la línea Ross 308, alimentados por 7 semanas (61 – 68 semanas), con niveles de 250, 500 y 750 ppb de AFB₁ y de 69 – 72 semanas sin AFB₁; no alteraron los parámetros productivos: peso corporal, producción de huevo, peso del huevo y gravedad específica de los huevos; tampoco los parámetros reproductivos: incubabilidad y calidad de los pollitos bebé, no se alteran la fisiología de los reproductores y sus progenies (Uttapatel et al., 2014); indicando que las aves adultas, son más resistentes a aflatoxicosis.

Sin embargo, los pollos que consumieron una dieta con 750 ppb de aflatoxinas, disminuyeron los parámetros clínicos: proteína, hemoglobina, triglicéridos, fosfolípidos (Brown et al., 1965). Pollos con una dieta de 1 500 ppb de aflatoxinas, con evidencias histopatológicas de hígado graso, necrosis y hiperplasia de los conductos biliares (Carnahan, 1966).

En Japón, alimentando patos, gallinas ponedoras, codornices y pollos broiler durante siete días, con dietas con 3 000 ppb de AFB₁; mediante HPLC se encontró, entre el octavo y décimo primer día, que los tejidos de los codornices tenían el más alto nivel de AFB₁ y fueron 10 veces más altas en el hígado que en el músculo (Bintvihok et al., 2002).

Las gallinas de postura comercial, con dietas contaminadas con 5 000 ppb de aflatoxinas durante 4 semanas, reducen la producción de huevos en el 35 %, el tamaño de los huevos y la proporción del tamaño de las yemas; sin embargo, la deposición de la cáscara de los huevos no se ve afectada y “este aumento del espesor de la cáscara puede afectar en reproductoras la eclosionabilidad debido a la reducción de los intercambios gaseosos entre el embrión y el ambiente” (Rosa et al., 2001). La AFB₁, pueden causar mortalidad embrionaria, los picos “ocurren en el tercio final de la incubación, pues los metabolitos de las aflatoxinas están concentrados en la yema, la que es utilizada por el embrión como fuente energética en este período del proceso de incubación” (Gimeno y Martins, 2011).

“Con respecto a los resultados de OTA del presente estudio, 100 % (20/20) de las muestras de soyas, resultaron positivos, (\bar{X} = 36,49 ppb; 3,3 – 80,9 ppb) y 20 % de las muestras con valores por encima de los NMP (50 ppb); \bar{X} = 70,025; 55,3 – 80,9 ppb. Cuyos resultados de muestras positivas (100 %), fueron muy superiores a los reportados en Inglaterra (19 – 36 %), sin embargo, éstos con mayores niveles (50 a 500 ppb)” (Leeson et al., 1995); y también superiores a los registros de los resultados de torta de soya, que ingresaron al Perú entre los años (2007 – 2011), procedentes de Paraguay, Argentina, Brasil y Estados Unidos; con 71,9 % y (\bar{X} = 1,99; 0,02 – 5,99 ppb (castro et al., 2015) y el 100 % no sobrepasaron los NMP (100 ppb). En el presente estudio, “20 % de las muestras que sobrepasaron los NMP, podrían ser un factor de riesgo para ocratoxicosis aguda; sin embargo, el 80 % serían responsables de ocratoxicosis crónica, siendo principalmente nefrotóxica, hepatotóxica” (Jay, 2000), inmunosupresoras teratogénicas y carcinogénicas (Lea et al., 1989). “La OTA esta clasificada por la IARC como un posible carcinogénesis”, además de haberse hallado, en concentraciones elevadas, en la sangre de personas con neuropatías endémicas. La enfermedad es endémica en Dinamarca, donde las tasas de porcinos con nefropatía esta altamente correlacionado con la alimentación contaminada con ocratoxina (Krogh, 1987). Es frecuentemente encontrado en carne de cerdo destinada al consumo humano (Krogh, 1987). En un estudio búlgaro, la contaminación de alimentos con ocratoxina y la presencia de ocratoxina en el suero humano era más común en familias con nefropatía balcánica endémica y tumores del tracto urinario que en las familias no afectadas (Fink, 1999).

“Referente a la toxina T – 2, 100 % (20/20) de las muestras de soyas, resultaron positivos (\bar{X} = 174,97 ppb; 120,0 – 303,5 ppb) y 60 % de muestras con valores por encima de los NMP (150 ppb); (\bar{X} = 200,075; 154,5 – 241,3). Los resultados de muestras positivas (100 %), superiores a los registros de torta de soya, que ingresaron al Perú entre los años (2007 – 2011), procedentes de Paraguay, Argentina, Brasil y Estados Unidos: 88,9 %, \bar{X} = 12,96; 0,08 – 47,33 y ninguno sobrepasó los NMP” (Castro et al., 2015).

4.2. Presentación de los resultados

Los resultados de ELISA competitivo directo, se obtuvieron mediante la densidad óptica, y a través del programa Neogen, se determinaron los niveles de micotoxinas para cada muestra en términos de absorbancia transfiriéndose a ppb (gK); los cuales se resumen en los cuadros 18, 19 y 20, y especificados en el anexo 6.

Cuadro 18. Niveles de aflatoxina B₁ en soya, según los distritos de la provincia de “Chincha”.

Distritos	Muestras analizadas	<u>Frecuencia</u>		<u>ppb (µg/K)</u>		<u>Valores del NMP (%)</u>	
		absoluta	relativa	Media	Rango	Menores	Mayores
Chincha Alta	2	2	100,0	1,400	1,30–1,50	100,00	00,00
Pueblo Nuevo	3	3	100,0	1,800	1,50–2,00	100,00	00,00
Grocio Prado	5	5	100,0	1,860	1,20–2,40	100,00	00,00
Sunampe	4	4	100,0	2,100	1,50–2,40	100,00	00,00
Alto Laran	6	6	100,0	1,767	1,00–3,40	100,00	00,00

Niveles máximos permitidos (NMP): AFB₁= 10 ppb (Gimeno, 2010).

Cuadro 19. Niveles de Ocratoxina A en soya, según los distritos de la provincia de “Chincha”.

Distritos	Muestras analizadas	<u>Frecuencia</u>		<u>ppb (µg/K)</u>		<u>Valores del NMP (%)</u>	
		absoluta	relativa	Media	Rango	Menores	Mayores
Chincha Alta	2	2	100,0	31,050	17,60–44,50	100,00	00,00
Pueblo Nuevo	3	3	100,0	34,670	21,80–47,20	100,00	00,00
Grocio Prado	5	5	100,0	43,000	17,40–80,90	80,00	20,00
Sunampe	4	4	100,0	36,050	16,90–55,30	75,00	25,00
Alto Laran	6	6	100,0	34,083	03,30–78,00	67,67	33,33

Niveles máximos permitidos (NMP): OA = 50 ppb (Gimeno, 2010).

Cuadro 20. Niveles de Toxina T – 2 en soya, según los distritos de la provincia de “Chincha”.

Distritos	Muestras analizadas	<u>Frecuencia</u>		<u>ppb (µg/K)</u>		<u>Valores del NMP (%)</u>	
		absoluta	relativa	Media	Rango	Menores	Mayores
Chincha Alta	2	2	100,0	120,950	120,00–121,90	100,00	00,00
Sunampe	4	4	100,0	194,850	125,70–303,50	50,00	50,00
Grocio Prado	5	5	100,0	169,500	142,20–219,60	40,00	60,00
Pueblo Nuevo	3	3	100,0	181,370	149,80–224,50	33,33	67,67
Alto Laran	6	6	100,0	181,033	146,70–241,30	16,67	83,33

Niveles máximos permitidos (NMP): Toxina T – 2 = 150 ppb (Gimeno, 2010).

“De acuerdo a los resultados, el 100 % de las muestras de soyas de los distritos de la provincia de Chíncha, considerado para el presente estudio, resultaron positivos a AFB₁, OTA y toxina T – 2”.

100 % de muestras analizadas para AFB₁, no sobrepasaron el NMP; 20 % y 60 % para OTA y toxina T – 2, sobrepasaron los NMP.

Especificando que el 100 % de las muestras procedentes del distrito de “Chíncha Alta”, resultaron con valores por debajo de los NMP para (AFB₁, OA y toxina T – 2). Pueblo Nuevo con 100 % de las muestras con resultados por debajo de los NMP para (AFB₁ y OTA) y 66,67 % de las muestras con valores por encima de los NMP para la toxina T – 2. Alto Laran con 33,33 % y 83,33 % de las muestras con resultados por encima de los NMP para OA y toxina T – 2 respectivamente. Grocio Prado con 20 % y 60 % de las muestras con valores por encima de los NMP para OA y toxina T – 2 respectivamente. Sunampe con 25 % y 50 % de las muestras por encima de los NMP para OA y toxina T – 2 respectivamente, como se puede apreciar en el cuadro 21.

Cuadro 21. Valores mayores a los niveles máximos permitidos de micotoxinas, según los distritos de la provincia de Chíncha

Distritos	<u>Valores mayores a los NMP (%)</u>		
	AFB ₁	OA	Toxina T – 2
Chíncha Alta	00,00	00,00	00,00
Sunampe	00,00	25,00	50,00
Grocio Prado	00,00	20,00	60,00
Pueblo Nuevo	00,00	00,00	66,67
Alto Laran	00,00	33,33	83,33

Niveles máximos permitidos (NMP): AFB₁ = 10 ppb, OA = 50 ppb y Toxina T – 2 = 150 ppb (Gimeno, 2010).

CONCLUSIONES

1. En la provincia de Chíncha, existe la presencia de AFB₁, OTA y toxina T – 2 en muestras de soya procedente de los “molinos de los Distritos de Alto Laran, Grocio Prado, Sunampe, Chíncha Alta y Pueblo Nuevo de la Provincia de Chíncha”. Los valores de AFB₁, no sobrepasan los NMP.
2. 20 % (4/20) de los valores para OTA, sobrepasan los NMP; los cuales podrían considerarse como un factor de riesgo para ocratoxicosis aviar aguda.
3. 60 % (12/20) de los valores de toxina T – 2, sobrepasaron los NMP. “Siendo la de mayor magnitud en el presente estudio; pudiendo ser un factor de riesgo para micotoxicosis aviar aguda”.

RECOMENDACIONES

1. Implementar “un sistema integrado basado en el empleo de especies vegetales” resistentes a mohos toxigénicos; empleo de fungistáticos, fungicidas, descontaminantes y insecticidas; Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (APPCC) para controlar todas las fases desde la producción en el campo hasta el consumidor final y garantizar la inocuidad de los insumos alimenticios.
2. Monitorear los niveles de micotoxinas de los insumos alimenticios que se expenden en los molinos a nivel nacional.
3. Evaluar el uso de fungistáticos, fungicidas, insecticidas y adsorbentes de micotoxinas en los insumos alimenticios.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alshannaq A. y Hyuk Yu Jae (2017). Review: Occurrence, Toxicity, and Analysis of Major Mycotoxins in Food. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14, 632.
- Arbaiza, F.; Córdova, R. ; Icochea, D. y Cutti, H. (2009). Detección de residuos de aflatoxinas en hígado de pollo en mercados de Lima. *Ciencia e Investigación*, 12(1), 37 – 40.
- Arrieta, D.; Pérez, M.; Gómez, C.; Molero, G.; Novoa E.; Rincón H. et al. (2006). Efecto del alimento contaminado con aflatoxina B1 (0,07 mg/kg) sobre la morfología hepática y actividad enzimática sérica (ast y alt) en pollos de engorde. *Revista Científica (Maracaibo)*, 16 (1), 39 – 47.
- Barbiroli, A.; Bonomi, F.; Benedetti, S.; Mannino, S.; Monti, L.; Cattaneo, T. y Iametti, S. (2007). Binding of Aflatoxin M1 to Different Protein Fractions in Ovine and Caprine Milk. *Journal of Dairy Science*, 90, 532–540.
- Barreiro, J. (2008). *Operaciones de conservación de alimentos a bajas temperaturas*. Sartenejas: Equinocio.
- Barros, G.; García, D.; Oviedo, M.; Ramirez, M.; Torres, A.; Lattanzio, V.; Pascale, M. y Chulze, S. (2011). Survey of T – 2 and HT – 2 toxins in soybean and soy meal from Argentina using immunoaffinity clean – up and high performance liquid chromatography. *World Mycotoxin Journal*, 4 (2), 189 – 197.
- Bean, G.; Schillinger, J. y Klarman, W. (1972). Occurrence of aflatoxins and aflatoxin – producing strains of *Aspergillus flavus* in soybeans. *Phytopathology*, 62:745 – 748.
- Bennett, J. y Klich, M. (2003). Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, 16, 497 – 516.
- Bintvihok, A.; Theingnin, S. y Doiks. (2002). Residues of Aflatoxins B1 in the liver, muscle and eggs of domestic fowls. *Journal of Veterinary Medicine*, 64 (11), 1037 – 1039.
- Bottalico, A. y Perrone, G. (2002). Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small – grain cereals in Europe. *European Journal of Plant Pathology*, 108, 611–624.
- Castro, J.; Alvarado, A.; Koga, Y. y Tinoco, R. (2015). Cuantificación de Micotoxinas en ingredientes alimenticios utilizados en la dieta de Aves

- Comerciales. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 26(4), 558 – 564.
- Calori, M.; Rodrigues, P.; Hercoton, G.; Micotti, G.; Tadeu, C.; Charles, D. y Costa, A. (2018). Aflatoxin B1 and zearalenone in soybeans: occurrence and distribution in whole and defective kernels. *Food Additives and Contaminants: Part B*, 11 (4), 273-280.
- Cevallos, A.; Ávila, E.; Rosiles, R. y Flores, C. (2007). Evaluacion de cuatro adsorbentes y/o inactivadores de micotoxinas en dietas de pollos de engorda contaminadas con ocratoxinas. Memorias del XXXII Convención Nacional de la Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas. Guerrero, Acapulco.
- Contreras, S. y Osorio, L. (2018). Producción Avícola. Boletín estadístico mensual de la Producción y comercialización de productos avícolas. Ministerio de Agricultura y Riego, Mes Julio.
- Coronel, M.; Sanchis, V.; Ramos, A. y Marin, S. (2010). Review. Ochratoxin A: Presence in human plasma and intake estimation. *Food Science and Technology International*, 16, 5 – 18.
- Creppy, E. (2002). Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicology Letters*, 127, 19 – 28.
- Diario Oficial de la Union Europea. (2006). Establecimiento de los metodos de muestreo y de análisis para el control oficial del contenido de micotoxinas en los productos alimenticios. Reglamento (CE) N° 401/2006.
- Diaz, G.; Squires, E.; Julian, R. y Boermans, H. (1994). Individual and combined effects of T – 2 toxin and DAS in laying hens. *British Poultry Science*, 35, 473 – 485.
- Doehlert, D.; Wicklow, D. y Gardner, W. (1993). Evidence implicating the lipoxygenase pathway in providing resistance to soybeans against *Aspergillus flavus*. *Phytopathology*, 83, 1473 – 1477.
- Domínguez, M. (2005). Las toxinas como agresivos químicos: micotoxinas. Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia, 121–187.
- Duarte, S. ; Pena, A. y Lino, C. (2010). A review on ochratoxin A occurrence and effects of processing of cereal and cereal derived food products. *Food Microbiology*, 27, 187–198.

- Ehrlich, K. y Ciegler, A. (1985). Effect of phytate on aflatoxin formation by *Aspergillus parasiticus* grown on different grains. *Mycopathologia*, 92, 3 – 6.
- Etzel, R. (2002). Mycotoxins. *Journal of the American Medical Association*, 287, 425 – 427.
- FAO (2003). Manual sobre la aplicación de análisis de peligros y de puntos críticos de control (APPCC) en la prevención y control de los micotóxicos. Estudio FAO Alimentación y Nutrición N° 73.
- Farag, R.; El Leithy M.; Basyony, A. y Daw, Z. (1986). Effects of varied substrates on aflatoxin production by *A. parasiticus*. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 63, 1024 – 1026.
- Fernandez Pinto, V.; Vaamonde, G.; Brizzio, S. y Apro, N. (1991). Aflatoxin production in soybean varieties grown in Argentina. *Journal of Food Protection*, 54, 542 – 545.
- Fernandez Surumay, G.; Negron, G.; Isea, G. y Sanchez, E. (2000). Reporte de análisis cuantitativo de aflatoxinas por el método ELISA en muestras de materias primas de alimento balanceado para aves provenientes de una planta ubicada en el Municipio Mara del Estado Zulia, Venezuela. *Revista Científica – Facultad de Ciencias Veterinarias*, 10 (1), 63 – 68.
- Fierro, J. (2008). Toxicidad de la Aflatoxina B1 y Ocratoxina A en Pollo de Engorda. Laboratorio de Toxicología. NUTEK, S.A. de C.V. (CLANA).
- Fink, J. (1999). Mycotoxins: their implications for human and animal health. *Veterinary Quarterly*, 21, 115–120.
- Fromme, H.; Gareis, M.; Völkel, W. y Gottschalk, C. (2016). Overall internal exposure to mycotoxins and their occurrence in occupational and residential settings – An overview, *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 219, 143–165.
- Garzon, V. (2010). La soya, principal fuente de proteína en la alimentación de especies menores. Programa procesos agroindustriales. Centro de Investigación CORPOICA. La Libertad, Villavicencio, Meta, Colombia.
- Gimeno, A. (2010). Revisión de las concentraciones máximas tolerables para ciertas micotoxinas en animales. Miami, USA: Special nutrients, INC.
- Gimeno, A. y Martins, M. (2011). Micotoxinas y Micotoxicosis en animales y humanos. Miami, USA: Special nutrients, INC.

- Gonzales, F. y Yu, A. (2006). Cytochrome P450 and xenobiotic receptor humanized mice. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 46, 41 – 64.
- Gonzalo, J. y Diaz, G. (1995). Micotoxinas presentes en la soya y sus subproductos. Seminario – Taller control de calidad y usos de la soya integral en alimentación Animal. Cali, Colombia, Junio 29 – 30.
- Hesseltine, C. (1976). *Mycotoxins and Other Fungal Related Food Problems*. Washington: American Chemical Society Library.
- Hoerr, F.; Carlton, W.; Yagen, B. y Joffe AZ. (1982). Fundamental and Applied. *Toxicology*, 2, 121 – 124.
- Hu, X.; Hu, R.; Zhang, Z.; Li, P.; Zhang, Q. y Wang, M. (2016). Development of a multiple immunoaffinity column for simultaneous determination of multiple mycotoxins in feeds using UPLC – MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408, 6027–6036.
- International agency for research on cancer (IARC). (2012). Chemical agents and related occupations. A review of human carcinogens. In: IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Lyon: IARC, 100, 225–248
- Kaushik, G. (2015). Effect of processing on mycotoxin content in grains. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55, 1672–1683.
- Kensler, T.; Roebuck, B.; Wogan, G. y Groopman, J. (2011). Aflatoxin: a 50 – year odyssey of mechanistic and translational toxicology. *Toxicological Sciences*, 120 (1), 28 – 48.
- Königs, M.; Mulac, D.; Schwerdt, G.; Gekle, M. y Humpf, H. (2009). Metabolism and cytotoxic effects of T – 2 toxin and its metabolites on human cells in primary culture. *Toxicology*, 258, 106 – 115.
- Kos, J.; Jani'c E.; Jaji'c, I.; Krstovi'c, S.; Mastilovi'c, J.; Šari'c, B.; Jovanov, P. (2016). Comparison of ELISA, HPLC – FLD and HPLC – MS/MS methods for determination of aflatoxin M1 in natural contaminated milk samples. *Acta Chimica Slovenica*, 63, 747–756.
- Kralj, I. y Prosen, H. (2009). An overview of conventional and emerging analytical methods for the determination of mycotoxins. *International Journal of Molecular Sciences*, 10, 62–115.
- Laura, A.; Cristina, G. y Claudio, B. (2016). Mycotoxin detection. *Current Opinion in Biotechnology*, 37, 120–126.

- Leeson, S.; Diaz, G. y Summers, J. (1995). Poultry metabolic disorders and mycotoxins. University Books, Guelph, Ontario, Canada, 227–241.
- Li, J.; Yin, S.; Dong, Y.; Fan, L. y Hu, H. (2011). p53 activation inhibits ochratoxin A – induced apoptosis in monkey and human kidney epithelial cells via suppression of JNK activation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 411, 458 – 463.
- Liu, Y. y Wu, F. (2010). Global burden of aflatoxin – induced hepatocellular carcinoma: A risk assessment. *Environmental Health Perspectives*, 118, 818–824.
- Liu, Y.; Chang, C.; Marsh, G. y Wu, F. (2012). Population attributable risk of aflatoxin – related liver cancer: Systematic review and meta – analysis. *European Journal of Cancer*, 48, 2125 – 2136.
- Malir, F.; Ostry, V.; Pfohl, A. y Novotna, E. (2013). Ochratoxin A: Developmental and reproductive toxicity – an overview. *Reproductive Toxicology*, 98, 493 – 502.
- Mallmann, C.; Dilkin, P.; Zanini, L.; Hummes, R. y Pereira, C. (2007). Micotoxinas en Ingredientes para Alimento Balanceado de Aves. XX Congreso Latinoamericano de Avicultura. Brasil, Porto Alegre, 25 al 28 de septiembre.
- Marin, S.; Ramos, A.J.; Cano, G. y Sanchis, V. (2013). Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food and Chemical Toxicology*, 60, 218–237.
- Medina, J.; Fierro, J.; Lara, J.; Brito, V. y Forat, M. (2010). The effects of 1,2 ppm T – 2 Toxin on performance, lesions, and general health of male broilers and the efficiency of an organoaluminosilicate (mycotoxin binder). *Journal of Dairy Science*, 93, 282 – 283.
- Mirocha, C. (1977). XV Symposium Científico, Sección Española de la Asociación Mundial de Avicultura Científica (WPSA). Barcelona (España), 29 de Noviembre a 1 de Diciembre.
- Mitchell, N.; Bowers, E.; Hurburgh, C. y Wu, F. (2016). Potential economic losses to the US corn industry from aflatoxin contamination. *Food Additives and Contaminants: Part A*, 33, 540–550.

- Mulder, J.; Bondy, G.; Mehta, R. y Massey, T. (2015). The impact of chronic Aflatoxin B1 exposure and p53 genotype on base excision repair in mouse lung and liver. *Mutation Research*, 773, 63 – 68.
- Neogen Corporation. (2008). Veratox® HS Quantitative Aflatoxin High Sensitivity Test. USA.
- Neogen Corporation. (2012). Veratox® for Ochratoxin Grain. USA.
- Neogen Corporation. (2014). Veratox® for T – 2. USA.
- NRC (1994) Nutrient requirements of poultry. 9th Revised edition. National Academy Press, Washington, D.C. USA
- Ofitserova, M.; Nerkar, S.; Pickering, M.; Torma, L. y Thiex, N. (2009). Multiresidue mycotoxin analysis in corn grain by column high-performance liquid chromatography with postcolumn photochemical and chemical derivatization: Single-laboratory validation. *Journal of AOAC International*, 92, 15–25.
- Orata, F. (2012). Derivatization reactions and reagents for gas chromatography analysis. In *Advanced Gas Chromatography e Progress in Agricultural, Biomedical and Industrial Applications*. Rijeka, Croacia: In Tech.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2015). Los niños menores de 5 años representan casi un tercio de las muertes por enfermedades de transmisión alimentaria. Comunicado de prensa. Recuperado de <http://www.who.int/es/news-room/detail/03-12-2015>
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS). (2014). Segunda Conferencia Internacional sobre Nutrición. Recuperado de <http://www.fao.org/3/a-ml542s.pdf>.
- Ostry, V.; Malir, F.; Toman, J. y Grosse, Y. (2017). Mycotoxins as human carcinogens – the IARC Monographs classification. *Mycotoxin Research*, 33, 65–73.
- Parveen, F.; Nizamani, Z.; Gan, F.; Chen, X.; Shi, X.; Kumbhar, S.; Zeb, A.; Huang, K. (2014). Protective effect of selenomethionine on aflatoxin B1 – Induced oxidative stress in MDCK cells. *Biological Trace Element Research*, 157, 266–274
- Pascale, M. (2009). Detection methods for mycotoxins in cereal grains and cereal products. *Matice Srpske za Prirodne Nauke*, 117, 15–25.

- Pavón, M.; Blanco, R. y González, Alonso. (2007). Detección de ocratoxina A en higos secos utilizando el anticuerpo MAP1 y una técnica de ELISA competitivo. ISSN. RCCV, 1 (2), 1988 – 2688.
- Pereira, V.; Fernandes, J. y Cunha, S. (2014). Mycotoxins in cereals and related foodstuffs: A review on occurrence and recent methods of analysis. *Trends in Food Science and Technology*, 36, 96–136.
- Pestka, J. y Bondy, G. (1994). Immunotoxic effects of mycotoxins. In J. D. Miller and H. Trenhold (ed.), *Mycotoxins in grain. Compounds other than aflatoxins*. Eagan, St. Paul, Minn, 339–358.
- Pestka, J. (2007). Deoxynivalenol: Toxicity, mechanisms and animal health risks. *Animal Feed Science and Technology*, 137, 283–298.
- Pitt, J.; Taniwaki, M. y Cole, M. (2013). Mycotoxin production in major crops as influenced by growing, harvesting, storage and processing, with emphasis on the achievement of food safety objectives. *Food Control*, 32, 205 – 215.
- Pitt, J. y Miller, J. (2016). A Concise History of Mycotoxin Research. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(33), 7021–7033.
- Pozas, R. y Abad, J. (2010). *Adsorción de micotoxinas presentes en los alimentos mediante biopolímeros*. Trabajo fin de carrera, Universitat Politècnica de Catalunya, Barcelona.
- Prakash, B.; Singh, P.; Yadav, S.; Singh S. y Dubey, N. (2013). Safety profile assessment and efficacy of chemically characterized *Cinnamomum glaucescens* essential oil against storage fungi, insect, aflatoxin secretion and as antioxidant. *Food and Chemical Toxicology*, 53, 160 – 167.
- Prandini, A.; Tansini, G.; Sigolo, S.; Filippi, L.; Laporta, M. y Piva, G. (2009). On the occurrence of aflatoxin M1 in milk and dairy products. *Food and Chemical Toxicology*, 47, 984–991.
- Quinta, L. (1982) Publicações do Laboratorio Nacional de Engenharia e Tecnologia Industrial. *LNETI – DCEAI*, 10 (92), 1 – 12.
- Rahmani, A.; Jinap, S. y Soleimany, F. (2009). Qualitative and quantitative analysis of mycotoxins. Comprehensive Reviews In *Food Science And Food Safety Journal*, 8, 202–251.
- Rahmani, A.; Jinap, S.; Soleimany, F. (2010). Validation of the procedure for the simultaneous determination of aflatoxins ochratoxin A and zearalenone in

- cereals using HPLC-FLD. *Food Additives and Contaminants: Part A*, 27, 1683–1693.
- Rahmani, A.; Jinap, S.; Khatib, A.; Tan, C. (2013). Simultaneous determination of aflatoxins, ochratoxin A, and zearalenone in cereals using a validated RP – HPLC method and PHRED derivatization system. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 36, 600–617.
- Ramos, A. (2015). Muestreo y metodos de analisis de micotoxinas en alimentos. Universitat de Lleida, Unitat de Micologia Aplicada, Agrotecnio Center.
- Richard, J. (2007). Some major mycotoxins and their mycotoxicoses—An overview. *International Journal of Food Microbiology*, 119, 3–10.
- Ridgway, K. (2012). Sample preparation for food contaminant analysis. *LC GC Europe*, 25, 1–8.
- Ruiz, B. (2018). Nutrido crecimiento avícola en Latinoamérica 2017. *Industria Avícola*, 65 (4), 6 – 30.
- Shephard, G. (2008). Determination of mycotoxins in human foods. *Chemical Society Reviews*, 37(11), 2468 – 2477.
- Shephard, G. (2016). Current Status of Mycotoxin Analysis: A Critical Review. *Journal of AOAC International*, 99, 842–848.
- Shotwell, O.; Hesseltine, C.; Burmeister, H.; Kwolek, W.; Shannon, G. y Hall, H. (1969). Survey of cereal grains and soybeans for the presence of aflatoxin. II. Corn and soybeans. *Cereal Chemistry*, 46, 454 – 463.
- Shotwell, O.; Goulden, M.; Bennet, G.; Plattner, R. y Hesseltine, CW. (1977). Survey of 1975. wheat and soybeans for aflatoxin, zearalenone, and ochratoxin. *Journal - Association of Official Analytical Chemists*, 60, 778 – 783.
- Soriano, J. (2007). Micotoxinas en alimentos. Fernández Ciudad: Ediciones Díaz de Santos.
- Song, D. y Karr, A. (1993). Soybean phytoalexin, glyceollin, prevents accumulation of aflatoxin B1 in cultures of *Aspergillus flavus*. *Journal of Chemical Ecology*, 19, 1183 – 1194.
- Stoev, S. (2013). Food safety and increasing hazard of mycotoxin occurrence in foods and feeds. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53, 887–901.
- Stössel, P. (1986). Aflatoxin contamination in soybeans: role of protein inhibitors, zinc availability, and seed coat integrity. *Applied and Environmental Microbiology*, 52, 68 – 72.

- The Commission of the European Communities. (2006). The Commission Recommendation of 17 August 2006 on the presence of deoxynivalenol, zearalenone, ochratoxin A, T – 2 and HT – 2 and fumonisins in products intended for animal feeding (2006/576/EC). Official Journal of the European Union.
- Tran, S.; Smith, T. y Girgis, G. (2012). A survey of free and conjugated deoxynivalenol in the 2008 corn crop in Ontario, Canada, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92, 37–41.
- Trucksess, M.; Weaver, C.; Oles, C.; Fry, F.; Noonan, G.; Betz, J. y Rader, J. (2008). Determination of aflatoxins B1, B2, G1, and G2 and ochratoxin A in ginseng and ginger by multitoxin immunoaffinity column cleanup and liquid chromatographic quantitation: Collaborative study. *Journal of AOAC International*, 91, 511–523.
- Turner, N.; Subrahmanyam, S. y Piletsky, S. (2009). Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. *Analytica Chimica Acta*, 632(2), 168 – 180.
- Turner, N.; Bramhmbhatt, H.; Szabo, M.; Poma, A.; Coker, R. y Piletsky, S. (2015). Analytical methods for determination of mycotoxins: An update (2009–2014). *Analytica Chimica Acta*, 901, 12–33.
- Uttpatel, R.; Santos C.; Rosa, P.; Forgiarini, J.; Londero, A.; Toledo, T.; Vivas, C. y Pontin, K. (2014). Poultry scientific fórum. Universidad Federal de Santa María, Brasil.
- United States Department of Agriculture Foreign Agricultural Service. (2016). World Agricultural Production. United States Department of Agriculture. Recuperado de: <http://usda.mannlib.cornell.edu/usda/current/worldag-production/worldag-production-06> - 10 - 2016.
- Yazar, S. y Omurtag, G. (2008). Fumonisin, trichothecenes and zearalenone in cereals. *International Journal of Molecular Science*, 9, 2062–2090.
- Williams, P. (1991). The principles of grain handling and transportation, in: Smith JE, Henderson RS. (Eds) *Mycotoxins and Animal Foods* (pp. 247 – 276). Florida: CRC Press.
- Yao, H.; Hruska, Z. y Di Mavungu, D. (2015). Developments in detection and determination of aflatoxins. *World Mycotoxin Journal*, 8, 181–191.

- Zhen, Z.; Qing, X. y Li, Ch. (2018). Effects of gamma irradiation on aflatoxin B1 levels in soybean and on the properties of soybean and soybean oil, *Applied Radiation and Isotopes*, 139, 224 – 230.
- Zhonghua Zhong Liu Za Zhi. (2018). Strategies of primary prevention of liver cancer in China: Expert Consensus (2018). *Chinese Journal of Oncology*, 40(7), 550 – 557.
- Zugong, Y.; Feng, W.; Jing, T.; Xuewen, G. y Ran, A. (2018). Protective effects of compound ammonium glycyrrhizin, L – arginine, silymarin and glucorolactone against liver damage induced by ochratoxin A in primary chicken hepatocytes. *Molecular medicine reports*, 18, 2551 – 2560.

Anexo 1. Preparación y extracción de la micotoxina de la muestra



Trituración de muestra de soya



Pesado de la muestra



Mezclado de muestra y metanol

Anexo 2. Detección de Aflatoxina

Veratox Procedure for Aflatoxin HS

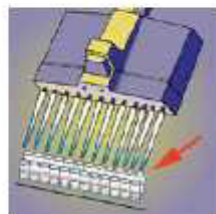
Note: Please read kit instructions completely before performing test.
Questions? Call 800/234-5333 or 517/372-9200.



1. Add 100 μ L conjugate to red marked mixing wells.



2. Add 100 μ L controls and samples to the red marked mixing wells.



3. Mix. Transfer 100 μ L to the antibody wells. Incubate for 10 minutes.



4. Dump liquid from antibody wells.



5. Wash wells thoroughly 5 times with deionized water.



6. Tap out water on absorbent paper towel.



7. Transfer 100 μ L substrate from reagent boat to antibody wells using 12-channel pipette. Incubate for 10 minutes.



8. Transfer 100 μ L Red Stop from reagent boat to antibody wells.



9. Read results using a microwell reader with a 630 nm filter.

Product Specifications

Lower limit of detection:	0.5 ppb
Range of quantitation:	1 ppb - 8 ppb
Controls provided:	0, 1, 2, 4 and 8 ppb
Testing time:	20 minutes
Antibody cross-reactivity:	Total aflatoxins (B_1 , B_2 , G_1 , G_2)



620 Leshar Place • Lansing, MI 48912
800/234-5333 (USA and Canada only) • 517/372-9200 • fax: 517/372-2006
e-mail: foodsafety@neogen.com • www.neogen.com

©Neogen Corporation 2007. Neogen and Veratox are registered trademarks of Neogen Corporation, Lansing, MI.

V-Afla45 1007

Anexo 3. Detección de Ocratoxina

Veratox Procedure for Ochratoxin

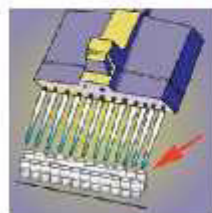
Note: Please read kit instructions completely before performing test.
Questions? Call 800/234-5333 or 517/372-9200.



1. Add 100 μ L conjugate to each red-marked mixing well.



2. Add 100 μ L controls and samples to their respective wells.



3. Mix. Transfer 100 μ L to antibody wells. Incubate for 10 minutes.



4. Dump liquid from antibody wells.



5. Wash 5 times with de-ionized water.



6. Tap out water on paper towel.



7. Transfer 100 μ L substrate from reagent boat to antibody wells using 12-channel pipettor. Incubate for 10 minutes.



8. Transfer 100 μ L Red Stop from reagent boat to antibody wells.



9. Read results using a microplate reader with a 650 nm filter.

Product Specifications

Lower limit of detection: 1 ppb
Range of quantitation: 2 ppb - 25 ppb
Controls provided: 0, 2, 5, 10, 25 ppb
Testing time: 20 minutes
Antibody cross-reactivity: Ochratoxin A 100%, Ochratoxin B 18%



520 Leshie Place • Lansing, MI 48912
800/234-5333 (U.S.A. and Canada only) • 517/372-9200 • fax: 517/372-7006
e-mail: foodsafety@neogen.com • www.neogen.com

©Neogen Corporation 2007. Neogen and Veratox are registered trademarks of Neogen Corporation, Lansing, MI.

V-Diox-1007

Anexo 4. Detección de toxina T – 2

Veratox Procedure for T-2/HT-2 Toxins

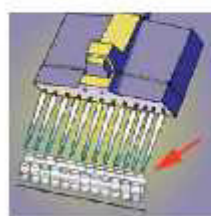
Note: Please read kit instructions completely before performing test.
Questions? Call 800/234-5333 or 517/372-9200.



1. Add 100 μ L conjugate to each red-marked mixing well.



2. Add 100 μ L controls and samples to their respective wells.



3. Mix. Transfer 100 μ L to antibody wells; incubate for 5 minutes.



4. Dump liquid from antibody wells.



5. Wash wells thoroughly 5 times with deionized water.



6. Tap out water on absorbent paper towel.



7. Transfer 100 μ L substrate from reagent boat to antibody wells using 12-channel pipettor. Incubate for 5 minutes.



8. Transfer 100 μ L Red Stop from reagent boat to antibody wells.



9. Read results using a microwell reader with a 650 nm filter.

Product Specifications

Lower limit of detection: 10 ppb
Range of quantitation: 25 ppb - 250 ppb
Controls provided: 0, 25, 50, 100 and 250 ppb
Testing time: 10 minutes
Antibody cross-reactivity: T-2 Toxin 100%, HT-2 100%.



670 Leshar Place • Lansing, MI 48912
800/234-5333 (USA and Canada only) • 517/372-9200 • Fax: 517/372-2006
e-mail: foodafety@neogen.com • www.neogen.com

©Neogen Corporation 2009. Neogen and Veratox are registered trademarks of Neogen Corporation, Lansing, MI.

V-12HT2 0909

Anexo 5. Técnica de recolección de datos: ELISA competitivo directo



Equipos, materiales y reactivos ELISA



Análisis de los extractos de soya



Resultados cualitativos



Resultados cuantitativos: lector Biotek ELX800GIDX con filtro de 650 nm.

Anexo 6. Resultados de los niveles de micotoxinas en las muestras de soya, según los Distrito de la Provincia de Chincha

Distrito	N°	Molinos	Aflatoxina B ₁		Ocratoxina A		Toxina T – 2	
			ppb	Valores mayores al NMP	ppb	Valores mayores al NMP	ppb	Valores mayores al NMP
Chincha Alta	1	Granja Don Augusto EIRL	1,3	Negativo	17,6	Negativo	120,0	Negativo
	2	La Granjita de Wilber	1,5	Negativo	44,5	Negativo	121,9	Negativo
Pueblo Nuevo	3	Agropecuaria Pariona	2,0	Negativo	21,8	Negativo	224,5	Positivo
	4	Melchorita	1,9	Negativo	47,2	Negativo	169,8	Positivo
	5	Granja Doña Bertha	1,5	Negativo	35,0	Negativo	149,8	Negativo
Grocio Prado	6	Agricola Santa Clarita SAC	2,4	Negativo	47,4	Negativo	145,2	Negativo
	7	Elisa Bertha	1,7	Negativo	17,4	Negativo	168,0	Positivo
	8	Granja Avicola Santa Marcelita	1,2	Negativo	37,5	Negativo	172,5	Positivo
	9	Granja A y F	1,7	Negativo	80,9	Positivo	142,2	Negativo
	10	Fundo el Colorado	2,3	Negativo	31,8	Negativo	219,6	Positivo
Sunampe	11	Agropecuaria Mesias SRL	2,4	Negativo	55,3	Positivo	146,7	Negativo
	12	Agropecuaria Saravia SAC	1,5	Negativo	16,9	Negativo	125,7	Negativo
	13	Anibal Ponce	2,5	Negativo	39,0	Negativo	303,5	Positivo
	14	Agropecuaria Valerio EIRL	2,0	Negativo	33,0	Negativo	203,5	Positivo
Alto Laran	15	Avicola Lusita	1,2	Negativo	35,8	Negativo	190,8	Positivo
	16	Moliservice El Chotano	3,4	Negativo	11,6	Negativo	241,3	Positivo
	17	Avicola Esgrima	1,4	Negativo	03,3	Negativo	192,9	Positivo
	18	Granja Avicola REC SAC	1,0	Negativo	09,9	Negativo	154,5	Positivo
	19	Granja Monsterrat E.I.R.L.	1,4	Negativo	78,0	Positivo	146,7	Negativo
	20	Chilpina SAC	2,2	Negativo	65,9	Positivo	160,3	Positivo

Niveles máximos permitidos (NMP): AFB₁ = 10 ppb, OA = 50 ppb y Toxina T – 2 = 150 ppb (Gimeno, 2010).